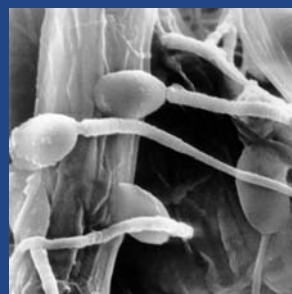
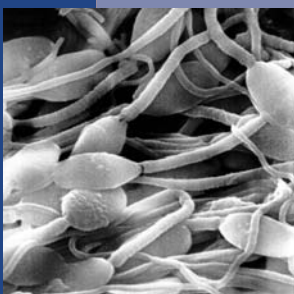
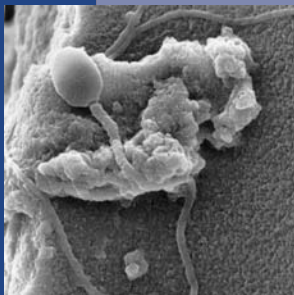


EJAKULATGEWINNUNG UND EJAKULATANALYSE BEI KRALLENAFFEN (Callitrichidae; Platyrrhini; Primates)

ALEXANDER SCHNEIDERS

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2005

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2005

© 2005 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

Aus dem Deutschen Primatenzentrum GmbH,
Abteilung Reproduktionsbiologie, Göttingen
Betreuer Prof. Dr. J. K. Hodges

Eingereicht über die Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie
der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der
Justus-Liebig-Universität Gießen
im Fachbereich vertreten durch Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

**Ejakulatgewinnung und Ejakulatanalyse
bei Krallenaffen
(Callitrichidae; Platyrrhini; Primates)**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

ALEXANDER SCHNEIDERS

Tierarzt aus Zell/Mosel

Gießen 2004

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

1. Berichterstatter: Prof. Dr. J.K. Hodges

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.05.2005

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	4
2.1	Die Familie der Callitrichidae (Platyrrhini; Primates)	4
2.1.1	Der Weißbüschelaffe (<i>Callithrix jacchus</i>)	4
2.1.2	Der Braunrückentamarin (<i>Saguinus fuscicollis</i>)	5
2.1.3	Der Lisztaffe (<i>Saguinus oedipus</i>)	5
2.2	Männlicher Geschlechtsapparat, Spermatogenese und Grundlagen der Ejakulation	8
2.2.1	Männlicher Geschlechtsapparat und Spermatogenese	8
2.2.2	Grundlagen der Ejakulation	10
2.3	Gewinnung von Ejakulaten und Spermatozoen bei Primaten	11
2.3.1	Gewinnungsmethoden bei Primaten	11
2.3.2	Elektroejakulation unter Verwendung von Rektalsonden (<i>rectal probe elektroejaculation</i> ; RPE)	13
2.3.3	Penile Vibrostimulation (PVS)	18
2.4	Ejakulatuntersuchung bei Primaten	19
2.4.1	Makroskopische und mikroskopische Ejakulatuntersuchung	19
2.4.2	Ejakulatkoagulation bei Primaten	20
2.4.3	Spermatozoenmotilität	21
2.4.4	Morphologie und Morphometrie	21

3	Material und Methoden	23
3.1	Tiere	23
3.1.1	Versuchstiere	23
3.1.2	Haltung	23
3.1.3	Fütterung	24
3.2	Ejakulatgewinnung	24
3.2.1	Elektroejakulation (RPE)	24
3.2.1.1	Tiere	25
3.2.1.2	Geräte	25
3.2.1.3	Allgemeinanästhesie / Narkose	28
3.2.1.4	Elektrische Stimulation	28
3.2.1.5	Versuchsdurchführung	29
3.2.2	Penile Vibrostimulation (PVS)	32
3.2.2.1	Tiere	32
3.2.2.2	Geräte	32
3.2.2.3	Versuchsdurchführung	34
3.3	Ejakulatuntersuchung	36
3.3.1	Behandlung der Ejakulate vor der Analyse und makroskopische Ejakulatuntersuchung	36
3.3.2	Mikroskopische Ejakulatuntersuchung	37
3.3.2.1	Spermatozoenkonzentration	37
3.3.2.2	Anteil lebender Spermatozoen	38
3.3.2.3	Motilität und kinematische Parameter	38
3.3.2.4	Spermatozoenmorphologie	44
3.4	Statistik	48

4	Ergebnisse	49
4.1	Elektroejakulation (RPE)	49
4.1.1	Reaktion der Tiere	49
4.1.2	Erfolgsquote der RPE	49
4.1.2.1	<i>Callithrix jacchus</i>	49
4.1.2.2	<i>Saguinus fuscicollis</i>	55
4.1.2.3	<i>Saguinus oedipus</i>	58
4.1.3	Analyse der mittels RPE gewonnenen Ejakulate der drei Spezies <i>C. jacchus</i> , <i>S. fuscicollis</i> und <i>S. oedipus</i>	60
4.1.3.1	Makroskopische Ejakulatuntersuchung	61
4.1.3.2	Mikroskopische Ejakulatuntersuchung	63
4.2	Penile Vibrostimulation (PVS)	71
4.2.1	Reaktion der Tiere	71
4.2.2	Erfolgsquote der PVS	72
4.2.3	Vergleich der Parameter von Ejakulaten gewonnen mittels RPE und PVS bei <i>C. jacchus</i>	73
4.2.3.1	Makroskopische Ejakulatuntersuchung	74
4.2.3.2	Mikroskopische Ejakulatuntersuchung	74
5	Diskussion	80
5.1	Elektroejakulation (RPE)	80
5.2	Parameter von mittels RPE gewonnenen Ejakulaten der drei Krallenaffenspezies <i>C. jacchus</i> , <i>S. fuscicollis</i> und <i>S. oedipus</i>	85
5.3	Penile Vibrostimulation (PVS) und Vergleich der Parameter der mittels RPE und PVS gewonnenen Ejakulate bei <i>C. jacchus</i>	89

6	Zusammenfassung	93
7	Summary	95
8	Literaturverzeichnis	96
9	Anhang	109
10	Danksagung	119

1. Einleitung

Die Familie der Krallenaffen (*Callitrichidae*) stellt eine artenreiche Gruppe innerhalb der Neuweltaffen (*Platyrrhini*) dar und ist über weite Teile des tropischen und subtropischen Süd- und Mittelamerika verbreitet (Hershkovitz, 1977; Rylands et al., 1993; Heymann, 1997). Viele Spezies dieses Taxons sind in ihren freilebenden Beständen bedroht, zum Teil sind die Bestände auf ein kritisches Maß gesunken (Hilton-Taylor, 2000; Mittermeier et al., 2000) und die Zucht in Gefangenschaft spielt eine zunehmend wichtige Rolle für die Erhaltung der Arten (Ballou et al., 2002).

Einige Vertreter der Krallenaffen haben als Modell in der biomedizinischen Forschung Verwendung gefunden [z.B. *Callithrix jacchus* (Broadmeadow & Gower, 2000), *Saguinus oedipus* (Clapp et al., 1985; Tobi et al., 2000), *Saguinus fuscicollis* (Kuederling & Heistermann, 1997; Alipour et al., 2002; Chudy et al., 2002)]. Vor allem der Weißbüschelaffe (*Callithrix jacchus*) gilt als wichtiges Modell in der reproduktionsbiologischen Forschung (Hearn, 1983, 1994, 1995; Hodges 1988). Besonders in den letzten Jahren hat er sich für *in vitro* Studien zur Reifung von Oozyten, Fertilisation und Embryonalentwicklung bewährt (Wilton et al., 1993; Marshall et al., 1998; Gilchrist et al., 1997, 2001; Nayudu et al., 2003).

Die weite Verbreitung, die *C. jacchus* in Laborzuchten gefunden hat, und das umfangreiche Wissen über seine Reproduktionsphysiologie, machen den Weißbüschelaffen auch zu einem wichtigen Modell für die Entwicklung von assistierenden Reproduktionstechniken, wie der künstlichen Besamung, *in vitro*-Fertilisation, Embryotransfer, Gefrierkonservierung von Gameten und Embryonen sowie Aufbau einer Genreserve.

Derartige Techniken könnten bei der Zucht und Erhaltung der genetischen Diversität von in Menschenobhut gehaltenen Spezies eine zunehmend wichtige Rolle spielen (Cranfield et al., 1988; Bavister & Boatman, 1989; Cranfield et al., 1993; Holt et al., 1996; Morrell & Hodges, 1998). So könnte zum Beispiel der genetische Austausch zwischen Populationen durch die Versendung von gefrierkonservierten Gameten/Embryonen unterstützt oder erst ermöglicht werden. Darüber hinaus könnte der Einsatz von assistierenden Reproduktionstechniken (z.B. künstliche Besamung mit frischen oder gefrierkonservierten Spermatozoen, *in vitro* –

Fertilisation) dazu beitragen, die Zuchtergebnisse zu verbessern. Zum einen betrifft dies die gezielte Zucht zur Erhaltung der genetischen Diversität in kleinen isolierten Populationen wie z.B. in Forschungseinrichtungen gehaltene Primatenkolonien, könnte aber insbesondere für die Erhaltungszucht gefährdeter Spezies in Zukunft zunehmend wichtig werden.

Ein Faktor, der die reproduktionsbiologische Forschung sowie die Entwicklung und Anwendung assistierender Reproduktionstechniken bei Krallenaffen stark einschränkt, ist die Gewinnung ausreichender Mengen von Spermatozoen möglichst guter Qualität.

Als Routinemethode zur Gewinnung von Ejakulaten bei Primaten gilt die Elektroejakulation unter Verwendung von Rektalsonden (*rectal probe electroejaculation*, RPE) (Gould et al., 1978; Wildt, 1986; Schaffer et al., 1989b; Schaffer et al., 1991). Die RPE wird unter Allgemeinanästhesie durchgeführt und ist in den meisten Fällen die einzige Methode, die bei Wildtieren eingesetzt werden kann (Martin, 1978; Watson, 1978; Wildt, 1996). Insbesondere bei den größeren Altweltaffen ist diese Methode oft beschrieben und eingesetzt worden (Gould et al., 1978; Wildt, 1986; Schaffer et al., 1989b; Gould, 1990). Bei kleinen Arten ist die Durchführung der RPE jedoch mit praktischen Schwierigkeiten verbunden, schwer zu reproduzieren und im Ergebnis oft unzuverlässig. Dementsprechend gibt es bislang kaum Untersuchungen zur Anwendung der RPE bei Krallenaffen und Studien, die durchgeführt wurden, sind auf *C. jacchus* beschränkt (Cui et al., 1991; Morrell et al., 1996). Die Erfolgsquoten waren dabei jedoch sehr unterschiedlich.

Ein erstes Ziel dieser Arbeit war es daher verschiedene Protokolle der RPE bei Krallenaffen zu untersuchen, um eine durchführbare, sichere und zuverlässige Methode der Ejakulatgewinnung zu finden. Dies sollte bei drei Vertretern aus der Familie der Krallenaffen durchgeführt werden, dem Weißbüschelaffen (*C. jacchus*), dem Lisztaffen (*Saguinus oedipus*) und dem Braunrückentamarin (*Saguinus fuscicollis*). Darüber hinaus sollten für diese drei Spezies durch eine umfassende Analyse der gewonnenen Ejakulate spermatologische Basisdaten ermittelt werden.

Auch eine zuverlässig arbeitende RPE ist mit Nachteilen verbunden. Die Notwendigkeit der Allgemeinanästhesie schränkt die Häufigkeit mit der die RPE bei einem Tier angewendet werden kann deutlich ein. Darüber hinaus ist das

Ejakulatkoagulum in mittels RPE gewonnenen Ejakulaten häufig stärker ausgeprägt als in natürlichen Ejakulaten (Wildt, 1986; Schaffer et al., 1989b). Das Ejakulatkoagulum der Primaten verflüssigt sich nicht vollständig und kann einen Teil der Spermatozoen in sich einschließen (Wildt, 1986; Schaffer et al., 1989b). Dadurch wird das Volumen des nutzbaren Ejakulates und die Anzahl der frei schwimmenden Spermatozoen reduziert. Dieses Phänomen wirkt sich besonders bei den sehr kleinen Ejakulaten der Krallenaffen negativ auf deren Nutzungsmöglichkeiten aus. Aus diesen Gründen besteht auch Interesse an alternativen Methoden zur Ejakulatgewinnung bei Krallenaffen.

Eine vielversprechende Methode ist hierbei die Stimulation des Penis durch Vibration (*penile vibratory stimulation*, PVS). Diese Methode nutzt die natürliche Reflexkette und bedingt so eine annähernd natürliche Ejakulation (Beckermann et al., 1993). PVS erfordert keine Narkose/Sedation und wurde erfolgreich bei Totenkopffaffen (*Saimiri boliviensis*) eingesetzt (Yeoman et al., 1997; Yeoman et al., 1998). Neben einer im Vergleich zur RPE sehr hohen Erfolgsquote lieferte die PVS Ejakulate von besserer Qualität, größerem Volumen, höherer Dichte und einem höheren Anteil an motilen Spermatozoen.

In der Studie von Kuederling et al. (2000) wurde gezeigt, dass es möglich ist mit dieser Methode Ejakulate bei *C. jacchus* zu gewinnen. Allerdings war die Reaktion auf die Stimulation unbeständig, und die durchschnittliche Erfolgsquote von 35 % zu niedrig, um für die Praxis eine wirkliche Alternative darzustellen.

Ein weiteres Ziel war daher, ein modifiziertes Protokoll zur Durchführung der PVS bei *C. jacchus* zu entwickeln, um die Erfolgsrate zu verbessern und um eine Methode zu erhalten, die eine praktische Alternative zur RPE beim Weißbüschelaffen ist.

Außerdem sollte die Qualität der mittels PVS gewonnenen Ejakulate mit der Qualität von RPE-gewonnenen Ejakulaten verglichen werden.

2. Literaturübersicht

2.1 Die Familie der Callitrichidae (Platyrrhini; Primates)

Die Familie der Krallenaffen (Fam. *Callitrichidae*) ist eine sehr artenreiche Gruppe von kleinen Primaten innerhalb der Neuweltaffen (*Platyrrhini*) (Abbildung 4). Das Taxon umfaßt die vier Gattungen *Callithrix* (Marmosetten), *Saguinus* (Tamarine), *Leontopithecus* (Löwenäffchen) und *Cebuella* (Zwergseidenäffchen) und stellt mit einem Körpergewicht von 80g (Zwergseidenäffchen, *Cebuella pygmaea*) bis 700g (Goldlöwenäffchen, *Leontopithecus rosalia*) die kleinsten simischen Primaten (Heymann, 1997; Dixon, 1998).

Krallenaffen zeichnen sich durch ihre geringe Körpergröße sowie durch das Vorhandensein von Krallen anstelle Nägeln an Finger und Zehen (außer der Großzehe) aus (Dixon, 1998; Heymann et al., 1998). Die tagaktiven Tiere leben in Familiengruppen, in denen die Fortpflanzung auf jeweils ein erwachsenes Weibchen beschränkt ist und in denen der väterliche Anteil an der Jungenfürsorge hoch ist (Dixon, 1998; Heymann et al., 1998). Zwillingsgeburten sind der Regelfall.

2.1.1 Der Weißbüschelaffe (*Callithrix jacchus*)

C. jacchus (Abbildung 1) ist mit einem Körpergewicht von 320g bis 360g (Araujo et al., 2000) und einer Kopf-Rumpf-Länge von 15 bis 20 cm der kleinste der in dieser Arbeit untersuchten Krallenaffenspezies. Der natürliche Lebensraum dieses Primaten ist der Regenwald an der Nordostküste Brasiliens. Die tagaktiven Tiere leben in Gruppen von 3 bis 15 Tieren und ernähren sich von Früchten, Baumsäften sowie Insekten.

Insbesondere auf dem Gebiet der Reproduktionsbiologie hat der Weißbüschelaffe in der biomedizinischen Forschung in den letzten 30 Jahren als Modellspezies zunehmend an Bedeutung gewonnen. Die geringe Körpergröße, die vergleichsweise einfache Haltung in Paaren oder Familiengruppen und die hohen Fortpflanzungsrate (frühe Geschlechtsreife, Zwillingsgeburten als Regelfall) haben dazu beigetragen,

dass *C. jacchus* eine der am häufigsten in der Forschung eingesetzten Primatenspezies ist (Hearn, 1983, 1994, 1995; Hodges, 1988; Fortman et al., 2002).

2.1.2 Der Braunrückentamarin (*Saguinus fuscicollis*)

S. fuscicollis (Abbildung 2) ist mit einem Körpergewicht von 350 g bis zu 440 g und einer Kopf- Rumpf-Länge von bis zu 24 cm (Leigh, 1994; Smith & Jungers, 1997) größer als *C. jacchus*, ist aber dennoch der kleinste Vertreter seiner Gattung. Sein Verbreitungsgebiet ist der westliche Amazonasraum, in dem die Spezies mit mehreren Unterarten vertreten ist (Heymann et al., 1998). In der 2000 IUCN *Red List of Threatened Species* (Hilton-Taylor, 2000) wird *S. fuscicollis* nicht aufgeführt und gilt in seinen Beständen als nicht gefährdet. Einige Unterarten dürften allerdings aufgrund der zunehmenden Vernichtung ihrer Lebensräume mittlerweile in ihren Beständen bedroht sein (Nowak, 1999). In europäischen Zoos sind Braunrückentamarine nur selten anzutreffen (Wilde et al., 1994).

2.1.3 Der Lisztaffe (*Saguinus oedipus*)

Das Körpergewicht von *S. oedipus* (Abbildung 3) liegt zwischen 350 und 550g, die Kopf- Rumpf-Länge zwischen 20 und 24 cm (Kaumanns et al., 1986; Leigh, 1994). Der natürliche Lebensraum dieser Spezies ist der Regenwald in Nordwestkolumbien, wo sie sich von Früchten, Knospen, Insekten und kleinen Wirbeltieren ernähren. Aufgrund der Zerstörung seines Lebensraumes und eines hohen Jagddruckes, gilt der Lisztaffe in seinen Populationen als bedroht (Hilton-Taylor, 2000), mit zur Zeit weniger als 2500 frei lebenden Tieren (Nowak, 1999).

Seit einigen Jahren gibt es angesichts der drohenden Ausrottung verstärkte Bemühungen, die Bestände in Menschenhand zu erfassen und die Zucht international zu koordinieren. Knapp 70% der in Menschenobhut lebenden Tieren befinden sich in Forschungsinstituten, die übrigen in Zoologischen Gärten (Kaumanns et al., 1986).

S. oedipus stellt ebenfalls eine wichtige Spezies für die biomedizinische Forschung und Verhaltensforschung (Ziegler et al., 1987, Ziegler et al., 1997) dar und ist ein

wichtiges Modell in der Erforschung von Colon-Krebs (Clapp et al., 1985; Tobi et al., 2000).



Abbildung 1: *Callithrix jacchus*



Abbildung 2: *Saguinus fuscicollis*



Abbildung 3: *Saguinus oedipus*

Abbildung 4: Systematik der Primaten (Martin, 1990)

Klasse: **Mammalia** (Säugetiere)

Ordnung: **Primates** (Primaten)

Unterordnung: **Prosimii** (Halbaffen)

Infraordnung: **Lemuriformes**

Superfamilie: **Lemuroidea**

Familie: **Cheirogaleidae** (Mauslemuren)

Lemuridae (Echte Lemuren)

Indriidae (Indiris)

Daubentoniidae (Fingertiere)

Infraordnung: **Lorisiformes**

Superfamilie: **Lorisoidea**

Familie: **Lorisidae**

Unterfamilie: **Lorisinae** (Loris)

Galaginae (Buschbabys)

Infraordnung: **Tarsiiformes**

Superfamilie: **Tarsioidea**

Familie: **Tarsiidae** (Koboldmakis)

Unterordnung: **Anthropoidea**

Infraordnung: **Platyrrhini** (Neuweltaffen)

Superfamilie: **Ceboidea**

Familie: **Cebidae**

Unterfamilie: **Cebinae** (Kapuziner- und Totenkopffaffen)

Aotinae (Nachtaffen)

Atelinae (Klammer- und Wollaffen)

Alouattinae (Brüllaffen)

Pithecininae (Sakis)

Callimiconinae (Springtamarine)

Familie: **Callitrichidae** (Marmosetten und Tamarine)

Infraordnung: **Catarrhini** (Altweltaffen)

Superfamilie: **Cercopithecoidea**

Familie: **Cercopithecidae**

Unterfamilie: **Cercopithecinae** (Meerkatzenartige)

Colobinae (Schlank- und Stummelaffen)

Superfamilie: **Hominoidea** (Menschenaffen und Mensch)

Familie: **Hylobatidae** (Siamangs und Gibbons)

Familie: **Pongidae** (Menschenaffen)

Familie: **Hominidae** (Menschen)

2.2 Männlicher Geschlechtsapparat, Spermatogenese und Grundlagen der Ejakulation

2.2.1. Männlicher Geschlechtsapparat und Spermatogenese

Der männliche Geschlechtsapparat umfaßt die Hoden (Testis) als Bildungsstätten der männlichen Keimzellen (Spermatozoen), den Nebenhoden (Epididymis) als Stätte der Reifung, Speicherung und Transport der Spermatozoen, die Ausführwege, die akzessorischen Geschlechtsdrüsen und das Begattungsorgan (Penis) (Harrison & Lewis, 1986).

Die paarigen Hoden sind die Zentrale des männlichen Reproduktionssystems. Dieses Organ bildet während des Prozesses der Spermatogenese die haploiden Keimzellen und ist Produktionsstätte des männlichen Geschlechtshormons Testosteron. Diese beiden Prozesse finden in zwei getrennten Kompartimenten des Hodens statt. Testosteron wird von den im Interstitium befindlichen Leydigzellen synthetisiert. In den Samenkanälchen (*Tubuli seminiferi contorti*) findet die Spermatogenese statt (Weinbauer & Nieschlag, 1999).

Die Spermatogenese ist ein komplizierter Prozeß und umfaßt die mitotischen Teilungen der Spermatogonien, die meiotischen Teilungen der Spermatozyten, die die haploiden Spermatiden hervorbringen, und die morphologische Differenzierung der runden Spermatiden zu den Spermatozoen. Der zeitliche Ablauf sowie das topographische Auftreten der verschiedenen Stadien in den *Tubuli seminiferi contorti* finden in streng koordinierter Weise statt und der gesamte Prozeß wird als Keimepithelzyklus bezeichnet (Harrison & Lewis, 1986; Weinbauer & Nieschlag, 1999).

Bezüglich der Anzahl der Spermatogonien, der Dauer der Spermatogenese und der räumlichen Anordnung der einzelnen Stadien der Spermatogenese in den *Tubuli seminiferi contorti* sind speziesspezifische Unterschiede zu finden (Weinbauer et al., 2001; Aslam et al., 2002). Zwei Hauptverteilungsmuster der Stadien des Keimepithelzyklus sind beschrieben. Bei dem einen Muster findet man im Querschnitt eines *Tubulus seminiferus contortus* nur Zellen eines Stadiums der

Spermatogenese, bei der andern Form findet man mehrere Stadien nebeneinander (Weinbauer & Nieschlag, 1999; Aslam et al., 2002).

Bei Primaten sind beide sowie intermediäre Formen zu finden (Clermond & Lebold, 1959; Clermont & Antar, 1973; Smithwick et al., 1996; Dietrich et al., 1986; Chowdhury & Marshall, 1980).

Beim Weißbüschelaffen sind in den Hodenkanälchen, ähnlich dem Menschen, mehrere Stadien der Spermatogenese nebeneinander zu finden (Haider et al., 1989; Weinbauer et al., 2001). Für andere Krallenaffenspezies liegen diesbezüglich keine Daten vor.

Über die *Tubuli seminiferi recti*, das *Rete testis* und die *Ductuli efferentes* gelangen die testikulären Spermien in der Nebenhoden (Epididymis). Dieser wird unterteilt in den Nebenhodenkopf (*Caput epididymidis*), -körper (*Corpus epididymidis*) und –schwanz (*Cauda epididymidis*). Der Nebenhoden liegt dem Hoden in Längsrichtung eng an und beherbergt den eng gewundenen Nebenhodenkanal, der seinerseits in den Samenleiter (*Ductus deferens*) mündet (Harrison & Lewis, 1986). Im Nebenhoden durchlaufen die noch unreifen Spermatozoen strukturelle, biochemische und funktionelle Veränderungen (Kumar & Phillips, 1991). Erst die Spermatozoen welche den Nebenhodenschwanz erreichen und dort gespeichert sind, haben die Fähigkeit zur Befruchtung der weiblichen Eizelle (Yeung et al., 1996, Cooper & Yeung, 1999). Erst dann haben die Spermatozoen die Fähigkeit zur Motilität und, nach Durchlaufen des Prozesses der Kapazitation, zur Bindung an die Zona pelucida, zur Akrosomreaktion und zur Fusion mit der Vitellinmembran der reifen Oozyte (Cooper & Yeung, 1999).

Der Samenleiter (*Ductus deferens*) bildet die Fortsetzung des Nebenhodengangs und verbindet diesen mit dem Beckenstück der Harnröhre. Um den Beckenabschnitt der Harnröhre gruppieren sich die akzessorischen Geschlechtsdrüsen. Bei Primaten ausgebildet sind die paarige Samenblasendrüse (*Glandula vesicularis*), die Prostata (*Glandula prostatica*) und die Bulbuorethraldrüse (*Glandula bulbourethralis*) (Harrison & Lewis, 1986)

Die Prostata besteht bei Primaten gewöhnlich aus zwei histologisch getrennten Teilen, dem cranialen und caudalen Lobus. Bei *Callithrix jacchus* allerdings ist nur

eine einlappige Prostata zu finden (Miraliga et al., 1970; Harrison & Lewis, 1986). Für andere Krallenaffenspezies liegen wiederum keine Daten vor.

Die *Glandula vesicularis* liefert bei Primaten die Hauptmenge des Seminalplasmas. Ein geringerer Teil wird von der Prostata beigesteuert. Der Anteil der Bulbourethraldrüse am Seminalplasma ist nur gering (Harrison & Lewis, 1986).

Der Penis der Krallenaffen ist zylindrisch, der Schaft ist mit verhornten Penisstacheln besetzt. Bei allen Krallenaffen ist ein *Os penis* ausgebildet. Die *Glans penis* ist klein und asymmetrisch. Die Öffnung der Urethra teilt die *Glans penis* in zwei Hälften. In die linke Hälfte der *Glans penis* ragt das *Os penis*. Die linke Hälfte ist dadurch größer als die rechte (HersHKovitz, 1977; Harrison & Lewis, 1986).

Das Skrotum bei Krallenaffen ist parapenial gelegen. Präputium und Skrotum gehen ineinander über und bilden eine Tasche in die der Penis zurückgezogen wird (Harrison & Lewis, 1986). Die Haut des Skrotums erscheint höckrig und beherbergt große Talgdrüsen und komplexe apokrine Drüsen, die ein Duftsekret produzieren (HersHKovitz, 1977; Harrison & Lewis, 1986).

2.2.2 Grundlagen der Ejakulation

Die Ejakulation ist ein komplizierter Prozeß von mehreren hintereinander geschalteten und ineinandergreifenden Reflexen. Ausgelöst wird die Ejakulation durch überschwellige Stimulation von in der *Glans penis* lokalisierten Temperatur- (Krause-Endkolben) und Mechanorezeptoren (Meissner- Tastkörperchen und Vater-Pacini-Lamellenkörperchen) (Kudlac, 1991).

Die Ejakulation kann im Wesentlichen in 2 Phasen unterteilt werden, die Emission und die eigentliche Ejakulation. In der Phase der Emission werden Spermatozoen und die Sekrete der akzessorischen Geschlechtsdrüsen in die Urethra eingeleitet. Gesteuert wird dieser Prozeß durch lumbale sympathische Nervenfasern, die über den *Plexus hypogastricus* laufen. Diese efferenten Nervenfasern sind zuständig für die Kontraktion der glatten Muskulatur von Nebenhoden und *Ductus deferens* und bewirken den Transport der Spermatozoen aus den Nebenhoden in die *Ampulla*

ductus deferentis. Darüber hinaus wird die Kontraktion der glatten Muskulatur der Prostata, der *Glandula vesicularis* und der Samenleiterampulle stimuliert sowie aufgrund α -adrenerger Stimulation der Schluß des Blasensphinkters bewirkt.

Nach der Emission des Inhalts des *Ductus deferens* und der akzessorischen Geschlechtsdrüsen in die Urethra erfolgt die eigentliche Ejakulation. Durch den Druckanstieg im hinteren Teil der Urethra werden über viscerale sensorische Fasern des *N. pudendus* reflektorisch rhythmische Kontraktionen der Beckenbodenmuskulatur ausgelöst, die die Seminalejektion einleiten (Ball, 1976; Martin, 1978; Schaffer et al., 1989a; Aumüller, 1991).

2.3 Gewinnung von Ejakulaten und Spermatozoen bei Primaten

2.3.1 Gewinnungsmethoden bei Primaten

Als Routinemethode zur Gewinnung von Ejakulaten bei Primaten gilt die Elektroejakulation unter Verwendung von Rektalsonden (*rectal probe electroejaculation*, RPE) (Gould et al., 1978; Wildt, 1986; Schaffer et al., 1989b; Schaffer et al., 1991). Die RPE wird unter Allgemeinanästhesie durchgeführt. Mit Elektroden versehene Sonden werden ins Rektum des Tieres eingeführt. Die anschließende elektrische Stimulation erfolgt in der Regel in rhythmischen Zyklen. Diese Methode ist bei vielen Primatenspezies beschrieben und eingesetzt worden.

Darüber hinaus sind mehrere andere Methoden der Ejakulatgewinnung bei Primaten beschrieben. Hierzu gehört die direkte Elektrostimulation des Penis, einer Variante der Elektroejakulation, die nur bei Primaten angewendet wurde. Des weiteren die Verwendung einer künstlichen Vagina, die Ejakulatgewinnung durch Masturbation, die Vaginalspülung unmittelbar nach Kopulation, die Gewinnung von Spermatozoen aus dem Nebenhoden unmittelbar *post mortem* oder nach Kastration und, als jüngste Methode, die Stimulation des Penis durch Vibration.

Die direkte Elektrostimulation des Penis bei Primaten wurde erstmals von Mastroianni & Manson (1963) beschrieben. Die Elektroejakulation wird durch

Anbringen von zwei Elektroden am Penis durchgeführt. Dazu wird das Tier nicht sediert und muss im sogenannten Primatenstuhl fixiert werden. Auch besteht die Gefahr, dass es durch Hitzeentwicklung an den Elektroden zu Verbrennungen am Penis kommen kann. Aus tierschützerischen Gründen ist diese Methode daher abzulehnen (Wildt, 1996). Darüber hinaus müssen die Tiere für diese Prozedur trainiert werden. Bisher ist diese Methode nur bei Makaken angewendet worden (Valerio et al., 1969; Gould & Mann, 1988; Lanzendorf et al., 1990; Sarason et al., 1991; Ramesh et al., 1998).

Natürliche Ejakulate können mittels künstlicher Vagina (KV) und durch Masturbation gewonnen werden. Die Anwendung beider Methoden ist nur nach intensivem Training der Tiere möglich und für die meisten Primaten ungeeignet. Bisher konnte nur von Menschenaffen mit diesen Methoden Ejakulate gewonnen werden und auch nur von einzelnen Tieren [KV: Schimpansen (Young et al., 1995; Fussell et al., 1973), Orang-Utans (Vandevoort et al., 1993), Gorillas (Brown & Loskutoff, 1998); Masturbation: Schimpansen (Gould & Martin, 1986)].

Durch Vaginalspülung (*vaginal washing*, VW) unmittelbar nach Kopulation können ebenfalls natürlich ejakulierte Spermatozoen gewonnen werden (Kendrick & Dixon, 1984; Kuederling et al., 1996; Morrell et al., 1996; Morrell, 1997a). Allerdings ist die Durchführung der VW zeit- und arbeitsintensiv. Ein umfangreiches Kolonienmanagement ist nötig, um vorhersagbar Kopulationen beobachten zu können. Darüber hinaus sind die so gewonnenen Ejakulate mit Zellen und Sekreten des weiblichen Genitale kontaminiert und ein nicht vorhersagbarer Teil des Ejakulates geht im weiblichen Genitale verloren (Kuederling et al., 1996; Morrell et al., 1996).

Spermatozoen können auch aus dem Nebenhoden unmittelbar *post mortem* oder nach Kastration gewonnen werden (Beehler et al., 1982; Marks et al., 1994; Wildt, 1996). Die Nutzung dieser Spermatozoenquelle ist naturgemäß nur auf Einzelfälle beschränkt und überdies in der Regel nicht planbar. Sie ist für experimentelle Zwecke oder zur Unterstützung von gezielten Zuchtmaßnahmen nicht geeignet (Morrell et al., 1996). Zur Sicherstellung von Spermatozoen von genetisch wertvollen

Zuchttieren ist diese Methode dennoch von Bedeutung (Watson, 1978; Durrant, 1990).

2.3.2 Elektroejakulation unter Verwendung von Rektalsonden (*rectal probe electroejaculation*, RPE)

Die RPE hat sich als gängigste und praktikabelste Methode zur Gewinnung von Ejakulaten bei Primaten etabliert (Gould, et al., 1978; Wildt, 1986; Schaffer et al., 1989b; Schaffer et al., 1991). Da diese Methode unter Allgemeinanästhesie durchgeführt wird, ist die Ejakulatgewinnung bei Tieren möglich, die die Handhabung, wie sie bei anderen Gewinnungsmethoden notwendig ist, nicht tolerieren. Im Prinzip ist die Durchführung einer sicheren Narkose die einzige Voraussetzung (Sojka, 1986). Seit der ersten Beschreibung der RPE bei Primaten von Weisbroth & Young (1965) wurde diese Methode bei Spezies aus vielen Primatenfamilien beschrieben. Insbesondere bei den großen Altweltaffen ist die RPE oft eingesetzt worden [Menschenaffen (Fussell et al., 1967; Warner et al., 1974; Platz et al., 1980; Bader, 1983; Schaffer et al., 1991; Young et al., 1995), Paviane (*Papio spp.*; Kraemer & Vera Cruz, 1969; Bornmann et al., 1988; Schaffer et al., 1992), verschiedene Makakenspezies (*Macaca spp.*; Gilman, 1969; Van Pelt & Keyser, 1970; Harrison, 1980; Schaffer et al., 1989a; Thomson et al., 1992), Grüne Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*; Seier et al., 1989)].

Bei kleinen Arten ist die Durchführung der RPE mit praktischen Schwierigkeiten verbunden, schwer zu reproduzieren und im Ergebnis oft unzuverlässig. Dementsprechend sind nur wenige Literaturstellen zur Anwendung der RPE bei kleinen Primaten zu finden. Da die Gruppe der Neuweltaffen vorwiegend Arten mit geringer Körpergröße beherbergt, sind nur wenige Arbeiten über Neuweltaffen zu finden. Eine Ausnahme ist der Totenkopffaffe (*Saimiri spp.*), der vergleichsweise häufig zur Ejakulatgewinnung mittels RPE herangezogen wurde (Bennett, 1967; Lang, 1967; Kuehl & Dukelow, 1974; Denis et al., 1976; Chen et al., 1981; Yeoman et al., 1997). Mit einem Körpergewicht von 850 - 950 g (Leigh, 1994; Smith & Jungers, 1997) sind Totenkopffaffen aber noch relativ groß. Bei den etwa halb so

großen Krallenaffen finden sich dagegen nur zwei detaillierte Literaturstellen, in denen die RPE bei *C. jacchus* beschrieben ist (Cui et al., 1991; Morrell et al., 1996). In den beiden Arbeiten sind höchst unterschiedliche Erfolgsquoten erzielt worden. Cui et al. (1991) haben von 16 Tieren in 80 Versuchen 77 Ejakulate gewonnen. Dies entspricht einer Erfolgsquote von rund 96 %. Dagegen haben Morrell et al. (1996) bei Versuchen, die im Deutschen Primatenzentrum, Göttingen, durchgeführt wurden, von 10 Tieren in 50 Versuchen nur 15 Ejakulate gewinnen können (Erfolgsquote: 30 %). Aus diesem Grunde bestand am Deutschen Primatenzentrum aktuell ein Bedarf nach einer besser funktionierenden Methode der RPE bei Krallenaffen.

Geräte

Zur Generierung des zur Stimulation notwendigen elektrischen Stroms werden eine Reihe von Geräten kommerziell angeboten. In der Regel arbeiten diese Geräte mit Wechselstrom und beinhalten ein Potentiometer, um die elektrische Spannung (V) regulieren und an die jeweilige Körpergröße der Tiere anpassen zu können (siehe Seite 17). In der Regel sind die angebotenen Geräte für Haustiere konzipiert, sind aber grundsätzlich an die Erfordernisse von Wildtieren adaptierbar (Howard et al., 1986; Wildt, 1996).

Die in der Literatur empfohlenen Frequenzen des zur Stimulation generierten Wechselstroms reichen von 20 Hz bis 60 Hz. Bei niedrigen Frequenzen (20 Hz) sind die Muskelkontraktionen der Tiere stärker und ein höherer Anteil an urinkontaminierten Ejakulaten kann auftreten (Schaffer et al., 1991). Thomson et al. (1992) haben bei der RPE von *Macaca nigra* keine Unterschiede zwischen der Verwendung von 30 Hz und 60 Hz festgestellt. Für die RPE von kleineren Spezies besteht nach Gould & Martin (1986) eine Tendenz zu höherer Effektivität bei Verwendung von Wechselstrom mit höherer Frequenz (50 Hz).

Morrell et al. (1996) haben bei der Verwendung verschiedener Frequenzen zur RPE von *C. jacchus* keine Unterschiede in der Effektivität feststellen können. Cui et al. (1991) machen zur Frequenz des zur Stimulation verwendeten Wechselstroms keine Angaben.

Rektalsonden

Zwei Typen von Rektalsonden werden zur RPE verwendet, solche mit zwei oder mehreren ringförmigen Elektroden und solche mit zwei oder drei in Richtung der

Längsachse angebrachten Elektroden aus Kupfer oder Messing (Fussell et al., 1967; Kraemer & Kuehl, 1980). Für die Anordnung und Abmessung der Elektroden gibt es keine allgemeingültigen Empfehlungen. Dabei handelt es sich um empirisch zu ermittelnde Parameter, die auch von den Vorlieben und Können des Operators abhängig sind. Lediglich für den Sondendurchmesser kann nach Wildt (1996) der Durchmesser des von der betreffenden Spezies abgesetzte Kotstrang als Anhaltspunkt dienen. Im Allgemeinen gelten Sonden mit Längselektroden als besser geeignet. Da Längselektroden in der Regel auf einer Seite der Sonde angebracht sind, ist der elektrische Reiz auf den Bereich der akzessorischen Geschlechtsdrüsen bzw. Beckenboden fokussierbar. Dadurch sind die sogenannten somatischen Reaktionen (insbesondere Kontraktion der Muskulatur der Hintergliedmaßen) weniger stark ausgeprägt (Merilan et al., 1982; Wildt, 1986). In neueren Arbeiten wurde aus diesen Gründen den Rektalsonden mit in Längsrichtung angeordneten Elektroden der Vorzug gegeben.

Zur RPE bei *C. jacchus* haben Cui et al. (1991) dagegen eine Rektalsonde mit Ringelektroden verwendet. Die Sonde hatte einen Durchmesser von 10 mm, die Ringelektroden waren 3 mm breit und in einem Abstand von 10 mm angebracht.

Morrell et al. (1996) verwendeten eine Rektalsonden mit 7 mm Durchmesser und vier Längselektroden.

Kraemer & Kuehl (1980) halten einen Rektalsondendurchmesser von 6 mm als angemessen für die RPE von *C. jacchus* und *Saguinus nigricollis*. Gould et al. (1978) geben für *C. jacchus* einen Durchmesser von 9,5 mm und für den deutlich größeren Goldlöwenaffen (*Leontopithecus rosalia*) einen Durchmesser von 6 mm an. Darüber hinaus werden in beiden Artikeln keine weiteren Angaben zur RPE von Krallenaffen gemacht.

Allgemeinanästhesie / Narkose

Die wichtigste Voraussetzung für die Durchführung der RPE ist eine sichere Narkose bzw. Anästhesie.

Bei Primaten hat sich Ketamin als wichtigstes Anästhetikum durchgesetzt (Brack et al., 1995). Ketamin ruft einen Zustand hervor, der als dissoziative Anästhesie bezeichnet wird. Dieser Zustand ist durch starke Analgesie, oberflächlichen Schlaf und Katalepsie charakterisiert. Im Vergleich zu den Narkotika führt Ketamin nicht zum Toleranzstadium (Löscher, 1994; Frey et al., 1996).

Hauptvorteil von Ketamin ist das Fehlen einer atem- und kreislaufdepressiven Wirkung. Darüber hinaus wirkt die von Ketamin bewirkte dissoziative Anästhesie, bei der Pharyngeal- und Laryngealreflexe erhalten bleiben, der Aspiration von Speichel entgegen. Eine alleinige Ketaminapplikation ist bei Primaten möglich. Daher wird die Injektionsanästhesie mit Ketamin als ideal für die Belange der RPE beschrieben (Gould et al., 1978; Wildt, 1986).

Phenothiazinderivate sowie Atropin blockieren die Erektion und Ejakulation (Roussel & Austin, 1968; Gould et al., 1978; Wildt, 1986) und sollten im Zusammenhang mit Narkosen zur RPE keine Verwendung finden. Xylazin, Diazepam und Phenothiazinderivate bewirken eine Relaxation der Urethramuskulatur und der Muskulatur des Blasenhalsses und können so eine Kontamination der Ejakulate mit Urin begünstigen (Wildt, 1996).

In neueren Veröffentlichungen zur RPE von Primaten hat daher meist Ketamin als alleiniges Injektionsanästhetikum Anwendung gefunden (Bader, 1983 bei *Gorilla gorilla*, *Pan troglodytes* und *Pan paniscus*; Schaffer et al., 1989a bei *Macaca silenus*; Seier et al., 1989 bei *Cercopithecus aethiops*; Schaffer et al., 1991 bei *Gorilla gorilla*; Thomson et al., 1992 bei *Macaca nigra*; Schaffer et al., 1992 bei *Papio anubis*; Gould et al., 1993 bei *Pan troglodytes*).

Nach Brack et al. (1995) lassen sich bei Primaten bei intramuskulärer Applikation von 10-20 mg Ketamin/kg Körpergewicht kleinere Eingriffe und Operationen durchführen. Kleinere Arten müssen höhere Dosen erhalten. Als Routinedosis zur Durchführung der RPE geben Gould et al. (1978) 10 mg/kg Körpergewicht an.

Morrell et al. (1996) haben zur RPE von *C. jacchus* Ketamin in einer Dosis von 25 mg/kg verabreicht. Cui et al. (1991) dagegen haben Saffan™ in einer Dosis von 0,6 ml/Tier intramuskulär verwendet.

Bei Saffan™ handelt es sich um eine Kombination zweier Steroide, dem Pregnandion-Derivat Alphaxalon sowie Alphadolonacetat in Verbindung mit dem Lösungsvermittler Cremophor. Saffan™ führt eine schnell einsetzende kurzzeitige Narkose herbei, mit guter Muskelrelaxation und guter Analgesie. Der schnelle Wirkungseintritt basiert auf der guten Membranpassage der Steroide in das ZNS.

Dies ist auch die Ursache für eine schnelle Elimination und damit verbunden einer kurzen Erholungszeit. Der Lösungsvermittler Cremophor kann bei Hunden zur Histaminfreisetzung aus den Mastzellen führen. Die Anwendung von Saffan™ bei Hunden ist daher kontraindiziert (Löscher, 1994; Frey et al., 1996). In Deutschland ist Saffan™ nicht im Handel. Im Vereinigten Königreich ist es zur Anwendung bei der Katze zugelassen.

Elektrische Stimulation

Eine Reihe von Stimulationsprotokollen wurden seit der ersten Anwendung der RPE bei Primaten beschrieben (Weisbroth & Young, 1965; Fussell et al., 1967; Roussel & Austin, 1968; Gould et al., 1978; Gould & Martin, 1986; Wildt, 1986; Schaffer et al., 1989a; Wildt, 1996). Allen gemeinsam ist die elektrische Stimulation in rhythmischen Intervallen. In der Regel wird die elektrische Spannung von 0 auf einen Wert von 2 V bis 4 V für 1 bis 2 s erhöht und wieder auf 0 V reduziert. Dieser Stimulationszyklus wird nach einer Pause wiederholt. Nach einer Anzahl von Stimulationen wird die Spannung erhöht bis die Ejakulation erfolgt. Die beschriebenen Protokolle unterscheiden sich im Wesentlichen in der initialen Spannung, der angewendeten Spannungsstufen und der Anzahl der Einzelstimulationen.

Nach Wildt (1986) kann sich die Wahl der initialen Spannungsstufe auf der Basis der Reaktion des Tieres, insbesondere des Ausmaßes der Muskelkontraktion der Hintergliedmaßen, orientieren.

Ausgehend von dem oben beschriebenen Basisprotokoll, muss das optimale Stimulationsprotokoll bezüglich Anzahl der Stimulationen, Dauer der Stromimpulse und Pausen zwischen den Elektrostimulationen empirisch ermittelt werden (Martin, 1978).

Cui et al. (1991) und Morrell et al. (1996) haben in ihren Versuchen zur RPE bei *C. jacchus* ebenfalls in rhythmischen Intervallen stimuliert.

Cui et al. (1991) machen dazu folgende Angaben: eine Einzelstimulation bestand aus Stromimpulsen von 4-5 V und von 1-3 s Dauer unterbrochen von einer Pause von 2-4 s. Bei einigen Tieren wurde eine Spannung bis 8 V verwendet. Es wird angegeben, dass in der Regel 60 s Stimulationsdauer bis zur Auslösung der Ejakulation ausreichten.

Morrell et al. (1996) arbeiteten mit Stromimpulsen von 6 s Dauer gefolgt von einer Pause von 3 s. Initiale Spannung waren 4 V. Nach einer Minute Stimulation wurde je nach Reaktion des Tieres (Erektion, Kontraktion der Hintergliedmaßen) mit 4 V weiter stimuliert oder um 1 V erhöht. Gegebenenfalls wurde nach einer Minute wiederum um 1 V erhöht und so weiter. Die Stimulationsdauer betrug bis zu 5 min, bei einigen Tieren wurde eine Spannung von bis zu 8 V verwendet.

Platz C.C. (P-T Electronics, Boring, USA, persönliche Mitteilung) empfiehlt für die RPE von *C. jacchus* die elektrische Stimulation in 3 Serien durchzuführen von je 35 Stimulationen pro Serien. Zwischen den Serien sollen 5 min Pause eingehalten werden. Bis zu 100-120 Einzelstimulationen sollen durchführbar sein. Eine Einzelstimulation wird durchgeführt, indem die elektrische Spannung von 0 V langsam auf die gewünschte Voltzahl erhöht wird. Diese Spannung wird für 2-3 s gehalten und danach über einen Zeitraum von 2-3 s auf 0 V reduziert. Nach 2-3 s Pause wird der Zyklus wiederholt.

2.3.3 Penile Vibrostimulation (PVS)

Die Elektroejakulation ist mit einigen Nachteilen verbunden. Wie schon erwähnt, ist die Durchführung insbesondere bei kleinen Arten schwierig. Die Notwendigkeit der Allgemeinanästhesie schränkt die Häufigkeit, mit der Ejakulate bei einem Tier gewonnen werden können, deutlich ein. Das Ejakulatkoagulum in mittels RPE gewonnene Ejakulaten ist zudem häufig stärker ausgeprägt als in natürlichen Ejakulaten.

Aus diesen Gründen besteht Bedarf nach alternativen Gewinnungsmethoden. Eine dieser Alternativen ist die Gewinnung von Spermatozoen durch Vaginalspülung unmittelbar nach Kopulation. Diese Methode hat bei *C. jacchus* Anwendung gefunden (Kuederling et al., 1996; Morrell et al., 1996). Die Vaginalspülung ist allerdings mit nicht unerheblichen Nachteilen verbunden (siehe Kapitel 2.3.1).

Eine vielversprechende alternative Gewinnungsmethode ist jedoch die Stimulation des Penis durch Vibration (*penile vibratory stimulation*, PVS). Durch überschwellige Stimulation der in der *Glans penis* lokalisierten Mechanorezeptoren wird unter

Ausnutzung des vollständigen Reflexbogens die Ejakulation ausgelöst (Beckermann et al., 1993; Yeoman et al., 1998). Die Ejakulation erfolgt dadurch annähernd natürlich. Die PVS erfordert darüber hinaus keine Narkose oder Sedation.

Schon 1969 konnte Schefels mit dieser Methode bei Rüden erfolgreich Ejakulate gewinnen. Die PVS wird in der Humanmedizin angewendet, um bei Männern mit Rückenmarkläsionen eine Ejakulation auszulösen (Sonksen et al., 1994, Brackett, 1999).

Bei Primaten ist die PVS bisher nur bei zwei Spezies zum Einsatz gekommen. Yeoman et al. (1997) haben die PVS bei Totenkopffaffen angewendet. Die Prozedur wurde von den Affen gut toleriert und erschien weitgehend stressfrei. Ejakulate konnten mit einer Erfolgsquote von 90 % gewonnen werden. Darüber hinaus lieferte die PVS Ejakulate von besserer Qualität als die RPE, mit größerem Ejakulatvolumen, höherer Spermatozoenkonzentration und einem höheren Anteil an motilen Spermatozoen.

Kuederling et al. (2000) haben die von Yeoman et al. (1997) beschriebene Methode auf den Weißbüschelaffen (*C. jacchus*) übertragen. Ejakulate von guter Qualität konnten gewonnen werden. Auch bei *C. jacchus* war die Prozedur weitgehend stressfrei durchführbar. Für praktische Anwendungen der PVS war die erzielte Erfolgsquote von 35% allerdings zu gering.

2.4 Ejakulatuntersuchung bei Primaten

2.4.1 Makroskopische und mikroskopische Ejakulatuntersuchung

Die Standardverfahren der Ejakulatuntersuchung umfassen wie in der Human- und Nutztierandrologie makroskopische und mikroskopische Untersuchungen. Makroskopische Untersuchungen sind die Bestimmung des Ejakulatvolumens und die Beurteilung der Konsistenz. Auch die Messung des pH-Werts erfordert keine besonderen Geräte. Die mikroskopische Untersuchung beinhaltet die Bestimmung der Motilität und der Vitalität der Spermatozoen, die Ermittlung der Spermatozoenkonzentration und die Analyse der morphologischen Charakteristika. Ausführliche Angaben zur Durchführung dieser Methoden finden sich im WHO

Handbuch (1992) sowie auf Primaten bezogen bei Wildt (1986) und Schaffer et al. (1989b).

2.4.2 Ejakulatkoagulation bei Primaten

Eine Besonderheit, die die Untersuchung und Verarbeitung von Ejakulaten bei Primaten erschwert, ist das Auftreten des sogenannten Ejakulatkoagulums. Ein Teil des Ejakulates von Primaten koaguliert nach der Vermischung der Sekrete der Prostata mit jenen der Samenblase (Roussel & Austin, 1967; Harrison & Lewis, 1986). Die Ausprägung und die Eigenschaften des Koagulums unterscheiden sich dabei bei den verschiedenen Primatenspezies. Bei Menschenaffen ist das Koagulum ähnlich wie beim Mensch von gallertiger Konsistenz und verflüssigt sich nach einer Zeit mehr oder weniger vollständig (Schaffer et al., 1989b; Gould, 1990). Anders sieht es bei den übrigen Primaten aus. Hier koaguliert ein Teil des Ejakulates zu einem festen Gebilde, welches sich in der Regel nicht verflüssigt (Van Pelt & Keyser, 1970; Settlage & Hendrickx, 1974; Schaffer et al., 1989b). Der Anteil des Koagulums am Gesamtejakulat beträgt in der Regel 30% – 50%, kann aber auch das ganze Ejakulat umfassen oder ganz fehlen (Weisbroth & Young, 1965). Ein nicht unerheblicher Teil der Spermatozoen kann im Koagulum eingeschlossen sein (Van Pelt & Keyser, 1970) und ist damit der weiteren Untersuchung und Verarbeitung entzogen.

Um dieses Problem zu lösen, wurden Versuche durchgeführt, das Koagulum durch die Behandlung mit Enzymen zu verflüssigen (Hoskins & Patterson, 1967; Roussel & Austin, 1967; Settlage & Hendrickx, 1974). Diese Enzymbehandlungen erwiesen sich allerdings als nachteilig in Hinblick auf die Vitalität und Motilität der Spermatozoen. Das Problem der Ejakulatkoagulation kann zum Teil umgangen werden durch Auffangen des Ejakulates mit einem Gefäß, welches ein geeignetes Medium enthält, oder durch zugeben des Mediums unmittelbar nach der Ejakulation. Dadurch soll einerseits verhindert werden, dass Spermatozoen während der Koagulation eingeschlossen werden, andererseits soll so den Spermatozoen die Möglichkeit gegeben werden, aus dem Koagulum auszutreten (Van Pelt & Keyser, 1970; Wildt, 1986; Schaffer et al., 1989b, Morrell et al., 1996).

2.4.3 Spermatozoenmotilität

Die Spermatozoenmotilität ist der wichtigste Ausdruck der Spermatozoenfunktion (Schaffer et al., 1989a) und der für die Fertilität prognostisch wichtigste Faktor (Krause, 1991). Aus diesem Grund gab und gibt es eine Reihe von Bestrebungen, die bis heute üblichen Schätzmethode durch objektive, exakte und reproduzierbare Verfahren zu ersetzen. Allgemeine Übersichten über diese Verfahren finden sich bei Boyers et al. (1989) und Mortimer (1997). In den letzten Jahren hat sich dabei die computerunterstützte Bildanalyse (CASA, *computer assisted sperm analysis*) durchgesetzt. Ein Computer digitalisiert und verarbeitet dabei das Bild, das eine mit einem Mikroskop verbundene Videokamera liefert. Über Grauwertstufen erkennt das System die Spermatozoen und berechnet in mehreren aufeinanderfolgenden Bildern die von den Spermatozoen zurückgelegte Bahn. Neben der Messung der Motilität ermöglichen diese Systeme zusätzlich die Bestimmung weiterer Bewegungsparameter wie die Geschwindigkeit und die Bahnform, die sogenannten kinematischen Parameter.

Anwendung dieser Methode bei der Analyse von Primatenspermatozoen finden sich bei Gould & Young (1996) und Gould et al. (1993) für Spermatozoen von Schimpansen (*Pan troglodytes*); Yeung et al. (1989) haben mit einem solchen System Spermatozoen von Javaneraffen (*Macaca fascicularis*) untersucht, und Morrell et al. (1996) und Morrell (1997b) jene des Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*).

2.4.4 Morphologie und Morphometrie

Die Untersuchung der Spermatozoenmorphologie ist in der Human- und Nutztierandrologie gleichermaßen ein wichtiger Aspekt der Ejakulatuntersuchung (Weitze & Müller, 1991; WHO, 1992). Die Beurteilung der Spermatozoenmorphologie erfolgt dabei durch visuelle Klassifizierung der fixierten und gefärbten Spermatozoen (WHO, 1992). Trotz Anstrengungen, die Klassifizierung in normale und veränderte Spermatozoen zu standardisieren (Menkeveld et al., 1990; WHO, 1992), handelt es sich nach wie vor um eine subjektive Methode. Aus diesem Grund gibt es auch für diesen wichtigen Teil der Ejakulatanalyse Bestrebungen, diesen mit Hilfe der

Computertechnik zu objektivieren. Eine Reihe von Arbeiten sind über die computergestützte Analyse von humanen Spermatozoen veröffentlicht worden (Wang et al., 1991; Davis et al., 1992; Kruger et al., 1993; Garrett & Baker, 1995; Steigerwald & Krause, 1998), aber auch im Bereich der Nutztierandrologie (Davis et al., 1993; Gravance et al., 1997; Boersma et al., 1999; Hirai et al., 1999) und Versuchstierkunde (Gravance & Davis, 1995) haben derartige Computersysteme Anwendung gefunden.

Gago et al. (1999) benutzten ein solches System um Spermatozoen von Javaneraffen (*Macaca fascicularis*) zu charakterisieren hinsichtlich der Parameter Fläche des Kopfes, Kopfumfang, Kopflänge und -breite und der Kopfform. Spermatozoen wurden darüber hinaus in morphologisch normale Spermatozoen und solche mit Kopf-, Mittelstück- und Schwanzdefekten klassifiziert.

3. Material und Methoden

3.1. Tiere

3.1.1. Versuchstiere

Es wurden drei Spezies aus der Familie der Krallenaffen (*Callitrichidae*) untersucht, der Weißbüschelaffe (*Callithrix jacchus*), der Braunrückentamarin (*Saguinus fuscicollis*) und der Lisztaffe (*Saguinus oedipus*). Alle Tiere stammten aus den Kolonien des Deutschen Primatenzentrums (DPZ). Mit Ausnahme von zwei vom Zoll beschlagnahmten und vom Bundesamt für Naturschutz am DPZ eingestellten Braunrückentamarinen, stammten alle Tiere aus der institutseigenen Zucht.

16 männliche *C. jacchus* im Alter von 3,5 bis 10 Jahren mit einem Körpergewicht von 330 bis 470 g, 6 männliche *S. fuscicollis* im Alter von 4,5 bis 14 Jahren mit einem Körpergewicht von 320 bis 580 g und 6 männliche *S. oedipus* im Alter von 2 bis 4 Jahren mit einem Körpergewicht von 460 bis 620 g wurden für die Untersuchung herangezogen.

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Tierversuche wurden im Rahmen eines durch die Bezirksregierung Braunschweig genehmigten Tierversuchsantrags (Nr. AZ: 509.42502/08-06.97) durchgeführt.

3.1.2. Haltung

Die Tiere wurden im Tierhaus des Deutschen Primatenzentrums in Räumen mit einer konstanten Temperatur von 26°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60% gehalten. Die Beleuchtungsdauer betrug 12 Stunden pro Tag.

Alle Tiere wurden in heterogeschlechtlichen Paaren oder Familienverbänden gehalten.

Für die Dauer der Versuche wurden die Weißbüschelaffenpaare jeweils in Edelstahlkäfigen mit den Abmessungen 100 x 50 x 80 cm untergebracht. Die Grundausstattung dieser Käfige bestand aus einer Schlafbox aus Edelstahl und zwei

hölzernen Sitzstangen. Diese Grundausstattung wurde durch Kletteräste und diverses Spielzeug ergänzt.

Die Braunrückentamarinenpaare wurden jeweils in Edelstahlkäfigen mit folgenden Abmessungen gehalten: Höhe 125 cm, Breite 100 cm, Tiefe 80 cm.

Die für die Studie verwendeten Lisztaffen wurden aus Gründen des Kolonienmanagements aus den Familienverbänden entnommen und für die Dauer der Versuche in zwei gleichgeschlechtlichen Dreiergruppen gehalten. Die Käfige der beiden Dreiergruppen waren 230 cm hoch, 150 cm breit und 80 cm tief und mit Schlafhäusern aus Holz, z.T. schwingend aufgehängten Sitzstangen und Kletterästen sowie diversem Spielzeug ausgestattet.

3.1.3. Fütterung

Die Tiere wurden mit Marmoset-Pellets (SSNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest) und einem Brei aus Quark und verschiedenen Futterzusätzen zur Ergänzung des Protein-, Vitamin- und Mineralstoffbedarfs gefüttert. Zusätzlich wurde Obst, Gemüse, Reis, Nudeln, Zwieback, Brot, gekochtes Hühnerei, gekochtes Hühnerfleisch, Mehlwürmer und Heuschrecken gegeben. Pasteurisiertes Trinkwasser stand *ad libitum* zur Verfügung.

3.2. Ejakulatgewinnung:

3.2.1 Elektroejakulation (RPE)

Wie in der Literaturübersicht schon erwähnt, existieren nur wenige Literaturstellen zur RPE von Krallenaffen. Darüber hinaus wurden sehr unterschiedliche Erfolgsraten beschrieben. Um eine möglichst hohe Erfolgsquote bei der Elektroejakulation zu erzielen, wurden daher verschiedene Methoden getestet. Diese Varianten basieren auf den drei Parametern Narkose, Rektalsondengeometrie und Stimulationsmuster.

3.2.1.1 Tiere

Mit 10 *C. jacchus*, 6 *S. fuscicollis* und 6 *S. oedipus* wurden Versuche zur Samengewinnung mittels Elektroejakulation durchgeführt. Jedes Tier wurde zu maximal 10 Elektroejakulationsversuchen herangezogen.

3.2.1.2. Geräte

Elektroejakulator

Zur Elektroejakulation der Tiere wurde der Elektroejakulator Modell 304 (P-T Electronics, Boring, Oregon, USA) benutzt. (Abbildung 5).

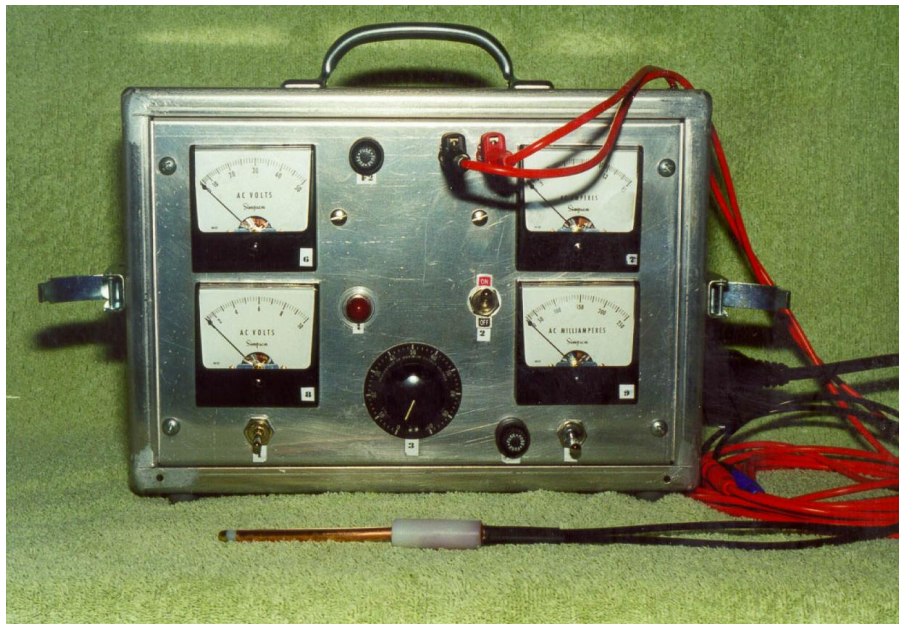


Abbildung 5: Elektroejakulator

Das Gerät liefert elektrischen Wechselstrom von 50 Hz mit einer Spannung von 0–45 Volt. Mit einem variablen elektrischen Regulierwiderstand (Potentiometer) kann die Spannung stufenlos eingestellt werden. Elektrische Spannung (V) und Stromstärke (A) werden mittels Volt- und Amperemeter kontrolliert. Dazu stehen zwei Voltmeter mit einer Skala von 0-10 V und 0-50 V sowie zwei Amperemeter mit einer Skala von 0-250 mA und 0-1,5 A zur Verfügung. Zwischen den beiden Volt- und den beiden Amperemetern kann je nach Bedarf mittels Schalter gewechselt werden.

Rektalsonden:

Es wurden Sonden mit Ringelektroden sowie solche mit in Längsrichtung angeordneten Elektroden getestet (Abbildung 6).

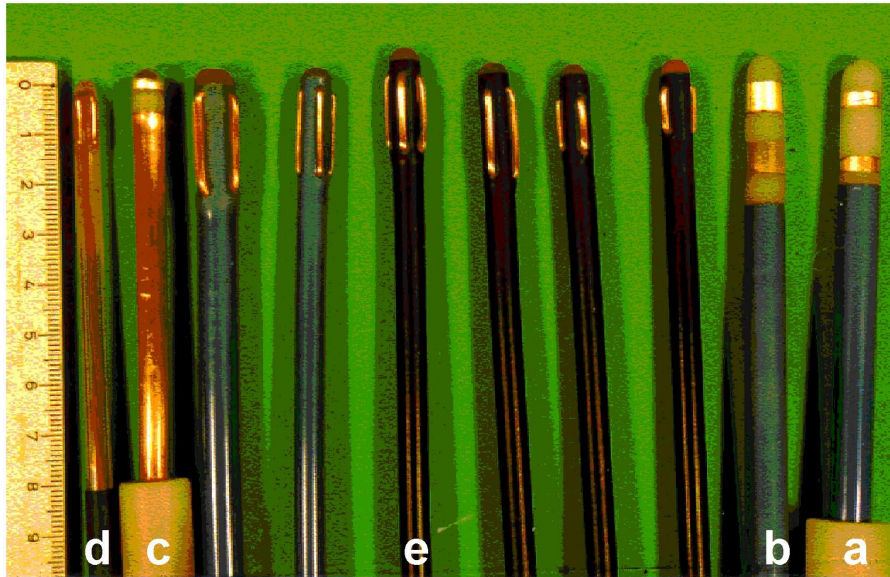


Abbildung 6: Rektalsonden

Die verwendeten Sonden hatten folgende Maße:

Sonde a:

Durchmesser der Sonde	: 8 mm
Ringelektroden	
Anzahl	: 2
Breite	: 3 mm
Abstand zwischen den Elektroden	: 10 mm
Abstand von der Sondenspitze	: 7 mm

Sonde b:

Durchmesser der Sonde	: 8 mm
Ringelektroden	
Anzahl	: 2
Breite	: 6 mm
Abstand zwischen den Elektroden	: 6 mm
Abstand von der Sondenspitze	: 6 mm

Sonde c:

Durchmesser der Sonde	: 6 mm
Spitze und Schaft aus Kupfer	
Zwischenring aus Kunststoff	
Länge der Spitze	: 5 mm
Breite des Zwischenrings	: 5 mm

Sonde d:

Durchmesser der Sonde	: 5 mm
Längselektroden	
Anzahl	: 2
Länge	: 10 mm
Durchmesser	: 1 mm
Abstand voneinander	: 3 mm
Abstand von der Sondenspitze	: 4 mm

Sonde e:

Durchmesser der Sonde	: 6 mm
Längselektroden	
Anzahl	: 3
Länge	: 15 mm
Durchmesser	: 1,5 mm
Abstand voneinander	: 4 mm
Abstand von der Sondenspitze	: 5 mm

Sonde a wurde von Cui et al. (1991) zur Elektroejakulation von *C. jacchus* beschrieben und entsprechend diesen Angaben nachgebaut.

Sonde b wurde ebenfalls selbst gebaut. Es handelt sich um eine Rektalsonde, die von Fussell et al. (1967) zur Elektroejakulation bei *Saimiri spp.* empfohlen wurde. Vertreter der Gattung *Saimiri* sind mit rund 900 g Körpergewicht (Smith & Jungers, 1997) knapp doppelt so schwer wie die hier untersuchten Vertreter der Familie Callitrichidae.

Bei **Sonde c** handelte es sich um eine Sonde, die im Institut für Reproduktionsmedizin der Universität Münster zur Elektroejakulation von Laborratten verwendet wurde und entsprechend der mündlichen Mitteilung von G. Weinbauer und M. Heuermann (Klinik für Reproduktionsmedizin, Universität Münster) nachgebaut.

Sonde d wurde von der Firma P-T Electronics (Boring, Oregon, USA) bezogen und war eine speziell zur Elektroejakulation von *C. jacchus* hergestellte Sonde.

Bei **Sonde e** handelte es sich wiederum um eine selbst gebaute Sonde. Die Maße der Sonde wurden durch Vermessungen der Beckenhöhle von *C. jacchus* festgelegt. Diese Messungen wurden bei Sektionen durchgeführt.

3.2.1.3 Allgemeinanästhesie / Narkose

Mit zwei verschiedenen Injektionsnarkotika wurden Versuche durchgeführt:

Mit Saffan™ (Mallinckrodt Veterinary Ltd., Harefield, UK, jetzt hergestellt von Schering-Plough, Animal Health Co.) in einer Dosierung von 1,2 – 1,8 mg/ 100g Körpergewicht bzw. 0,1 – 0,15 ml/100g Körpergewicht i.m. (Cui et al.,1991).

Alternativ wurde Ketaminhydrochlorid (Ketavet®, 100 mg/ml, Pfizer GmbH, Karlsruhe) in einer Dosierung von 15-20 mg/kg Körpergewicht i.m. (Brack et al., 1995) verwendet.

3.2.1.4 Elektrische Stimulation

Zwei verschiedene Stimulationsprotokolle kamen zur Anwendung.

Stimulationsprotokoll a:

Das erste Stimulationsprotokoll lehnte sich an die bei Cui et al. (1991), Morrell et al. (1996) sowie in der Bedienungsanleitung des Elektroejakulator Model 304 (P-T Electronics, Boring, Oregon, USA) beschriebenen Stimulationsmuster an.

Mit dem Potentiometer am Elektroejakulator wurde die elektrische Spannung innerhalb 2 s von 0 V auf die gewünschte Voltzahl erhöht, 2-3 s gehalten und anschließend innerhalb 2 s wieder auf 0 V erniedrigt. Nach einer Pause von 5 s wurde der Vorgang wiederholt. Begonnen wurde mit 3 oder 4 V. Bei jeder Voltzahl wurde 10 mal stimuliert und anschließend um 1 Volt erhöht. Bis maximal 8 V wurde dieser Stimulationszyklus wiederholt. Erfolgte eine Ejakulation wurde bei gleicher Voltzahl weiter stimuliert bis kein Ejakulat mehr gewonnen werden konnte. Danach wurde die Stimulation beendet.

Stimulationsprotokoll b :

Beim zweiten Stimulationmuster wurde ein Schalter zwischen Elektroejakulator und Sonde eingefügt. Mit dem Regulierwiderstand wurde 7 V eingestellt. Mit Hilfe des Schalters wurden 10 an/aus Impulse verabreicht. Jeder Stimulus wurde für 1-2 s gehalten. Zwischen den Einzelstimulationen wurden 10-12 s lange Pausen eingelegt.

Erfolgte keine Ejakulation wurde auf 8 V erhöht und mit weiteren 10 an/aus-Impulsen stimuliert. Danach wurde der Versuch beendet.

3.2.1.5 Versuchsdurchführung

Vorbereitung der Tiere:

Krallenaffen kopulieren mehrfach am Tag und unabhängig vom Zyklusstand des Weibchens (Abbott & Hearn, 1978; Kendrick & Dixon; 1984). Aus diesem Grund wurden die männlichen Tiere 24 Stunden vor den Versuchen von den weiblichen Tieren getrennt. Bei *C. jacchus* wurden dazu die Männchen in einen Käfig gesetzt, der mit Sichtkontakt an die Front des Käfigs des Weibchens gehängt wurde. Bei *S. fuscicollis* wurden die Käfige durch ein Trenngitter in zwei Abteilungen unterteilt. *S. oedipus* wurden für die Dauer der Versuche in zwei gleichgeschlechtlichen Dreiergruppen gehalten und mußten daher nicht getrennt werden.

Sechs bis zwölf Stunden vor den Versuchen wurde den Tieren das Futter entzogen. Nachdem die Tiere aus den Käfigen gefangen waren, wurden sie einer kurzen Allgemeinuntersuchung unterzogen. Die Injektionsstelle am Oberschenkel wurde desinfiziert und das Narkosemittel in die Oberschenkelmuskulatur injiziert. Anschließend wurde das Tier in eine dunkle Box gesetzt und an einen ruhigen Platz gestellt.

Nachdem das Tier in Narkose lag, erfolgte eine nochmalige kurze Allgemeinuntersuchung des Tieres. Insbesondere wurde der Anogenitalbereich auf Verletzungen und andere Veränderungen untersucht. Der Genitalbereich wurde trocken gereinigt

Durchführung der Elektroejakulation:

Die Elektroejakulation wurde von zwei Personen durchgeführt. Eine Person war für das Auffangen des Ejakulates verantwortlich. Die zweite Person führte die Rektalsonde und bediente den Elektroejakulator (Abbildung 7). Nachdem das Tier in Seitenlage verbracht wurde, lagerte die eine Person den Penis des Tieres vor. Die andere Person führte die mit Gleitgel gleitfähig gemachte Rektalsonde ins Rektum

des Tieres ein. Die Sonde wurde so weit eingeführt bis die Elektroden gerade im Rektum verschwunden waren. Bei Sonden mit Längselektroden mußte darauf geachtet werden, dass die Elektroden nach ventral gerichtet waren. Die Sonde wurde leicht nach ventral gedrückt, die Sondenspitze leicht nach ventral gekippt um optimalen Kontakt zu den akzessorischen Geschlechtsdrüsen herzustellen. Die Position der Sonde wurde zwischen den Stimulationen geringfügig nach kranial und kaudal verändert um den Punkt aufzufinden, an dem eine maximale Erektion erreicht werden konnte. Stimuliert wurde wie oben beschrieben. Nach Einsetzen der Ejakulation wurde stimuliert bis kein Ejakulat mehr austrat. Danach wurde der Versuch beendet.

Das Ejakulat wurde in ein vorgewärmtes 1,5 ml-Eppendorfgefäß aufgefangen (Abbildung 7). Nach Kontrolle der Sonde auf eventuelle Blutspuren und Untersuchung des Anogenitalbereichs wurde das Tier in einen kleinen Käfig (Größe: 30 x 30 x 30cm) verbracht und in einem ruhigen und abgedunkelten Raum unter eine Wärmequelle gelegt. Die Tiere wurden erst nach vollständigem Erwachen in ihre Käfige zurückgesetzt.

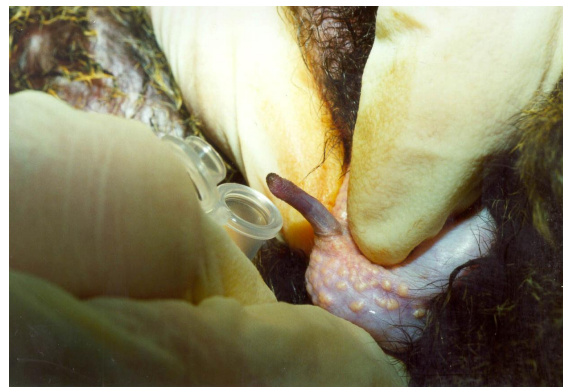


Abbildung 7: Elektroejakulation bei *C. jacchus*

Versuchsprotokolle

Versuchsprotokoll 1:

In ersten Versuchen wurde Saffan™ als Injektionsnarkotikum benutzt. Stimuliert wurde nach Stimulationsprotokoll a. Bei *C. jacchus* wurde Sonde a verwendet. Bei *S. fuscicollis* und *S. oedipus* fand Sonde b Verwendung, da diese Tiere etwas größer

als *C. jacchus* sind und mit dieser Sonde eine größere Kontaktfläche zu den akzessorischen Geschlechtsdrüsen erreicht werden sollte.

Diese Vorgehensweise orientierte sich an dem von Cui et al. (1991) beschriebenen Verfahren, da in dieser Studie eine sehr hohe Erfolgsquote erzielt wurde und daher die besten Aussichten auf eine erfolgreiche Elektroejakulation bot.

Da mit Ausnahmen bei *S. fuscicollis* mit diesem Verfahren keine befriedigende Erfolgsquote erzielt werden konnte, bestand die Notwendigkeit weitere Protokolle zu testen. Da von *C. jacchus* mehr Tiere zur Verfügung standen, wurden weitere Versuche zunächst bei *C. jacchus* durchgeführt, mit der Absicht, nur die erfolgreichste Methode auf die anderen beiden Spezies zu übertragen.

Versuchsprotokoll 2:

Bei den folgenden Versuchen wurden zur Elektroejakulation von *C. jacchus* Sonden mit Längselektroden verwendet. Sonde d und e kamen zur Anwendung. Stimuliert wurde nach Stimulationsprotokoll a.

Versuchsprotokoll 3:

In einer dritten Versuchsserie wurden die Tiere mit Ketamin in Narkose gelegt. Es wurde mit Sonde c gearbeitet. Stimuliert wurde nach Stimulationsprotokoll a.

Versuchsprotokoll 4:

In dieser Versuchsserie wurden die Tiere ebenfalls mit Ketamin narkotisiert. Auch kam wieder Sonde c zur Anwendung. Im Unterschied zur der Versuchen der Serie 3 wurde nach Stimulationsprotokoll b, mit an/aus-Impulsen, gearbeitet.

Versuchsprotokoll 5:

Da die Narkose mit Ketamin mit einigen Nachteilen verbunden war (Krampfen der Tiere; keine ausreichende Narkosetiefe; nach 10-15 Minuten wurde wieder ein Stadium erreicht, in dem eine Elektroejakulation nicht mehr durchzuführen war; dennoch sehr lange Nachschlafphase und damit verbunden erst spätes Zurücksetzen der Tiere in den Haltungskäfig) wurde wieder auf Saffan™ zurückgegriffen. Wie in Serie 4 wurde Sonde c verwendet und mit an/aus-Impulsen (Stimulationsprotokoll b) stimuliert.

Dies Protokoll kam auch bei *S. oedipus* zur Anwendung. Mit *S. fuscicollis* waren aus Gründen des Kolonimanagements keine weiteren Versuche mehr möglich.

3.2.2. Penile Vibrostimulation

3.2.2.1. Tiere

Mit sechs *C. jacchus* wurden Versuche zur Samensammlung mittels peniler Vibrostimulation (PVS) durchgeführt.

Von sechs weiteren Tieren wurden Samenproben für andere Projekte gewonnen. Teilweise gehen die dabei gewonnenen Daten in diese Arbeit ein.
drei bis 18 Versuche wurden pro Tier vorgenommen.

3.2.2.2 Geräte

Für die Durchführung der Vibrostimulation wurde ein akkubetriebener „FertiCare personal“ - Vibrator (Multiceps A/S, Hørsholm, Dänemark) verwendet (Abbildung 8).

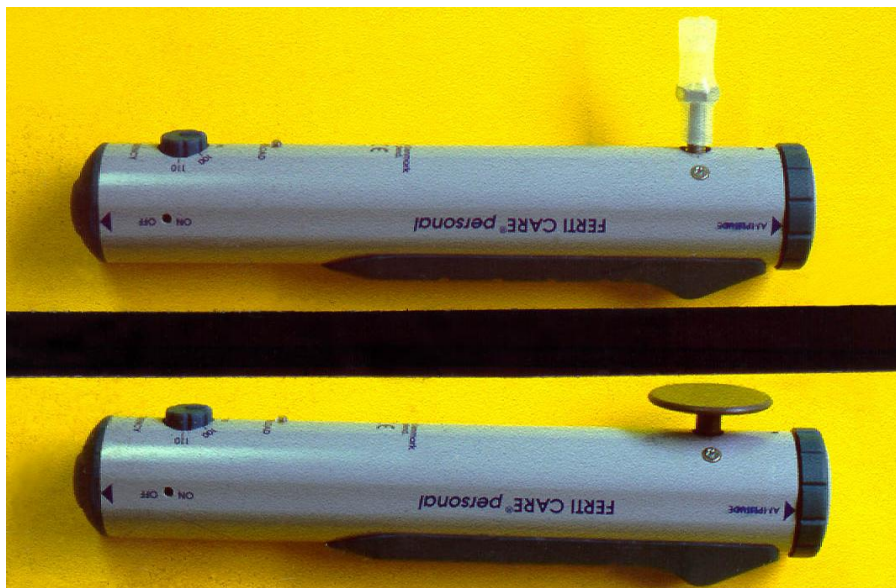


Abbildung 8: Ferti Care® personal - Vibrator

Das Gerät liefert eine vertikale Schwingung, deren Amplitude und Frequenz stufenlos von 0,5 bis 3,5 mm bzw. 70 bis 110 Hz einstellbar ist. Der Ferti Care® personal-Vibrator ist ein für humanmedizinische Anwendungen entwickeltes Gerät. Es wurde dergestalt modifiziert, dass die Vibrationsplatte (Abbildung 8 unten) durch eine Schraube ersetzt wurde, so dass mittels eines Stücks Silikonschlauch Glasröhrchen befestigt werden konnten (Abbildung 8 oben). Das Glasröhrchen diente zugleich zur Übertragen der Schwingungen und zum Auffangen des Ejakulats.

Es wurden speziell angefertigte Glasröhrchen mit einem Außen- bzw. Innendurchmesser von 5,0 bzw. 3,0 mm und 24 mm Länge (Schricket Chemieglas, Göttingen) verwendet.

3.2.2.3. Versuchsdurchführung



Abbildung 9:
Penile Vibrostimulation
(PVS) bei *C.jacchus*

Die Tiere wurden wie bei der Elektroejakulation 24 Stunden vor den Versuchen von den weiblichen Tieren abgetrennt. Dazu wurden auch hier die Männchen in einen Käfig gesetzt, der mit Sichtkontakt an die Front des Käfigs des Weibchens gehängt wurde.

Um jegliche Aufregung und Ablenkung des Tieres zu vermeiden, wurde die Prozedur in einem abgedunkelten Raum durchgeführt. Vor und während der Stimulation wurden dem Tier Belohnungen (Schaumzucker, Mehlwürmer, Nutrical®) angeboten (Abbildung 9 b).

Mit der mit einem Lederhandschuh geschützten Hand wurde das Tier auf einen speziell angefertigten Tisch über eine Tuschlinge gehalten, sodass ein freier Zugang zum Genitale gegeben war (Abbildung 9 a). Dabei wurden die beiden Hinterbeine ebenfalls vorsichtig manuell fixiert.

Mit einer Lichtquelle wurde von unten beleuchtet, sodass der Genitalbereich beleuchtet, das Tier selbst aber im Dunkeln blieb.

Vor der Stimulation wurden Penis und Präputium trocken gereinigt.

Stimulation:

Krallenaffen haben durch das parapenial gelegene Skrotum keinen pendulären sondern einen ins Präputium zurückgezogenen Penis (Abbildung 9 d). Der Penis wurde aus diesem Grund manuell leicht vorgelagert. Diese Manipulation schien den Tieren Unbehagen zu bereiten. Wichtig war daher den Penis vorsichtig vorzulagern und nur so weit, bis die Penisspitze sichtbar wurde. Stimuliert wurde durch Überstülpen des vorgewärmten vibrierenden Glasröhrchen über die Penisspitze und durch leichten

Druck gegen den Rand der Präputialöffnung (Abbildung 9 c).

Nach folgendem Schema wurde stimuliert:

1. Stimulationssequenz:

80 Hz, 1mm Amplitude

80 Hz, 1,5mm

90 Hz, 1,5mm

90 Hz, 2 mm für je maximal 30s

2 – 3 min Pause

2. Stimulationssequenz:

90 Hz, 1,5mm

90 Hz, 2mm

90 Hz, 2,5mm

90 Hz, 3mm für je maximal 30s

2-3 min Pause

3. Stimulationssequenz:

entspricht der 2. Sequenz.

In Einzelfällen wurde zusätzlich 20 s mit 100 Hz und 3 mm stimuliert.

Die Gesamtstimulationsdauer betrug damit maximal 6,5 min.

Das von Yeoman et al. (1997) und Kuederling et al. (2000) beschriebene Protokoll wurde in folgenden Punkten modifiziert: es wurde Glasröhrchen mit einem kleineren Innendurchmesser verwendet, um einen engeren Kontakt zum Penis herzustellen. Darüber hinaus wurde die Intensität der Stimulation schneller gesteigert. Wichtig war dabei, die Stimulation der Reaktion des Tieres anzupassen. Wurde eine adäquate Reizintensität erreicht, zeigte das Tier Reaktionen in Form von Wölben des Rückens und Verschieben des Beckens. Eine Erektion war kein guter Indikator für eine gute Stimulation. Zeigte das Tier eine starke Reaktion, wurde das Röhrchen nicht abgesetzt um Frequenz oder Amplitude zu erhöhen, sondern es wurde weiter über die 30 s hinaus stimuliert. War die Reaktion weniger stark wurde die Intensität der Stimulation um einen Schritt erhöht. Bei keiner oder kaum einer Reaktion empfahl

sich ein zügiges Steigern der Stimulationsintensität. In solchen Fällen wurde auch weniger als 30 s pro Stufe stimuliert.

Hatte ein Tier Urin abgesetzt, wurde die Stimulation unterbrochen um das Auffangröhrchen zu wechseln. Die Stimulation wurde dann an der Stelle fortgeführt, an der man unterbrochen hatte.

Nach Abschluß der Ejakulation wurde die Stimulation beendet.

3.3. Ejakulatuntersuchung

3.3.1 Behandlung der Ejakulate vor der Analyse und makroskopische Ejakulatuntersuchung

Alle Gerätschaften die mit dem Ejakulat in Berührung kamen wurden auf 37°C vorgewärmt.

Die Ejakulate wurden in 1,5 ml-Eppendorfcaps (RPE) bzw. Glasröhrchen (PVS) aufgefangen. An der Penisspitze verbliebene Anteile des Ejakulates wurden mit einer Eppendorfpipette abgenommen.

Aussehen, Farbe und Geruch des Ejakulates wurden beurteilt sowie die Ausprägung des Koagulums aufgezeichnet.

Je nach Größe des Ejakulates wurde es mit einer definierten Menge (25 – 100 µl) vorgewärmten Tyrodes-Laktat-Medium (Gilchrist et al., 1997) versetzt. Mit Hilfe einer Eppendorfpipette wurde vorsichtig gemischt und 20 min bei 37°C inkubiert.

Das Mischen mit Medium mit anschließender Inkubation wurde durchgeführt, um den Spermatozoen die Möglichkeit zu geben aus dem Koagulum auszutreten, aber auch um die sehr kleinen Ejakulate besser handhaben zu können.

Auf die Bestimmung des pH-Wertes wurde verzichtet, da dazu ein zu großer Anteil der Nativejakulate hätte verwendet werden müssen (Ejakulatvolumen im

Durchschnitt 18 – 40 µl). Eine pH-Wert Bestimmung nach der Verdünnung der Ejakulate mit gepufferten Medium war nicht mehr möglich.

Die Messung des Volumens erfolgte unter Verwendung einer Eppendorfpipette, bei der das zu aspirierende Volumen von 1-100 µl eingestellt werden konnte. Durch wiederholtes Aspirieren und wieder Ausstoßen des Ejakulates, bei dem das zu aspirierende Volumen der Pipette so lange verändert wurde bis das Ejakulat gerade vollständig aufgenommen werden konnte, wurde das Volumen ermittelt.

Da die Ejakulate unmittelbar nach der Gewinnung mit Medium versetzt wurden, wurde das tatsächliche Volumen aus der Differenz zwischen dem Volumen des verdünnten Ejakulats und dem Volumen des dem Ejakulat zugefügten Mediums berechnet.

Da bei kleinen und zudem noch z.T. gallertigen Proben die Volumenbestimmung schwierig ist, wurde zusätzlich das Gewicht der Ejakulate bestimmt. Auch hier wurde die Differenz zwischen dem Gewicht des verdünnten Ejakulates und dem Gewicht des zugefügten Mediums berechnet.

3.3.2 Mikroskopische Ejakulatuntersuchung

Die mikroskopische Ejakulatuntersuchung beinhaltete die Bestimmung der Spermatozoenkonzentration, des Anteils lebender Spermatozoen, der Motilität und die morphologische Beurteilung der Spermatozoen.

Die Untersuchung der Motilität und verschiedener kinematischer Parameter der Spermatozoenbeweglichkeit wurden mit einem CASA (*computer assisted sperm analysis*) - Gerät durchgeführt. Zusätzlich wurden Spermatozoen computerunterstützt vermessen.

3.3.2.1 Spermatozoenkonzentration

Die Konzentration der Spermatozoen wurde durch Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer entsprechend den Angaben im WHO Handbuch (1992) bestimmt.

Dazu wurden 5 µl der Spermatozoensuspension 1:10 bis 1:100 (entsprechend der geschätzten Spermatozoenkonzentration) mit destilliertem Wasser verdünnt. Eine Neubauer-Zählkammer wurde mit 10 µl dieser Verdünnung beschickt, die Spermatozoen ausgezählt und die Konzentration in Anzahl Spermatozoen pro ml berechnet. Berücksichtigt werden mußte dabei auch die initiale Verdünnung des nativen Ejakulates mit Tyrodes-Laktat-Medium.

3.3.2.2 Anteil lebender Spermatozoen

Der Anteil lebender Spermatozoen wurde ebenfalls nach den Angaben im WHO Handbuch (1992) durch Supravitalfärbung mit Eosin G-Lösung bestimmt. Diese Methode basiert darauf, dass tote Zellen mit beschädigter Plasmamembran das Eosin G aufnehmen und sich rot anfärben. Ein Tropfen der Spermatozoensuspension wurde auf einem Objektträger mit einem Tropfen Eosin G-Lösung vermischt. Unter dem Lichtmikroskop wurden zweihundert Spermatozoen ausgezählt und in lebende ungefärbte und tote gefärbte Spermatozoen eingeteilt.

3.3.2.3 Motilität und kinematische Parameter

Die Untersuchung der Motilität der Spermatozoen sowie die Analyse kinematischer Parameter der Spermienbeweglichkeit wurden mit einem CASA - Gerät, dem Hobson Sperm Tracker (Hobson Tracking Systems, Ltd, Sheffield, UK) ermittelt.

Aufbau des Hobson Sperm Tracker

Der Hobson Sperm Tracker (Abbildung 10) besteht aus einem Computer mit Pentium 100 MHz- Prozessor, ausgestattet mit Hobson Tracking Systems- Hard- und Software, zwei Monitoren, einem Olympus BH2-Mikroskop mit Fototubus (Okular 3.3x), Phasenkontrast-Einrichtung und einem beheizbaren Objektträgertisch mit Temperaturkontrolle (CO60, Linkam Scientific Instruments, Tadworth, U.K.) sowie einer Videokamera (Sony, CCD-IRIS Hyper HAD) und einem VHS-Videorecorder (Panasonic NV-J45), die entsprechend den Vorgaben des Herstellers miteinander verbunden wurden.

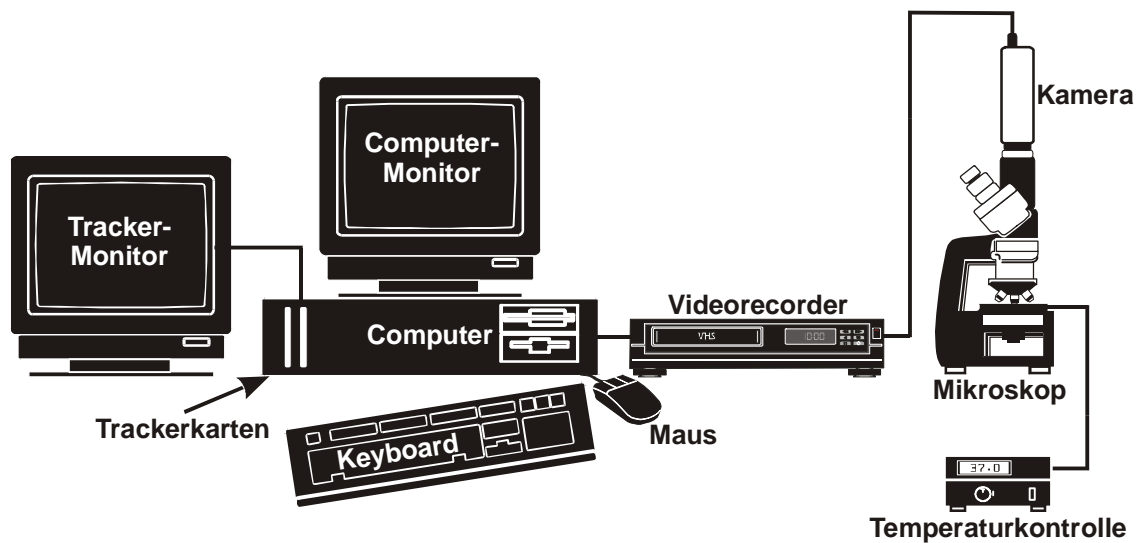


Abbildung 10: Der Hobson Sperm Tracker

Kalibrierung und Grundeinstellungen des Hobson Sperm Trackers

Zunächst mußte die Bildvergrößerung mit dem System kalibriert werden. Mit Hilfe der *Calibration*-Funktion und der Graduierung einer Zählkammer wurde auf dem *Tracker-Monitor* eine definierte Strecke abgemessen, die vom System als Referenz verwendet wurde.

Zur Grundeinstellung des Hobson Tracker mußten folgende Parameter der Bildverarbeitung eingestellt werden:

framing rate:

Die *framing rate* oder Videoaufnahmefrequenz betrug in Abhängigkeit vom verwendeten Videorecorder und Videokamera 50Hz.

threshold

Dabei handelt es sich um eine Komponente der Bildverarbeitung mit der im Fall der Dunkelfeldmikroskopie helle Objekte vom dunkleren Hintergrund abgegrenzt werden. Diese Schwellenempfindlichkeit hat Bedeutung für die Erkennung der Spermatozoen durch den Hobson Sperm Tracker. Bewegliche Objekte, die der Hobson Sperm Tracker als solche erkennt, werden mit einem Farbfleck belegt.

filter weightings

Dabei handelt es sich um vier Filter, die die Erkennung von Objekten optimiert.

search radius:

Bei einer Videoaufnahmefrequenz von 50 Hz beträgt das Intervall zwischen zwei Videoaufnahmen 20 ms. Innerhalb dieser Zeit hat sich ein Spermatozoon eine bestimmte Strecke fortbewegt. Der *search radius* ist nun die Distanz in Mikrometer, innerhalb der das System zwischen zwei Videoaufnahmen sucht, um ein verfolgtes Spermatozoon wiederzufinden. Der Hobson Sperm Tracker berechnet aus der Verbindung der Wiederfindungspunkte die Bewegungsbahn des Spermatozoons. Der *search radius* muss abhängig von der Videoaufnahmefrequenz und der Geschwindigkeit des sich fortbewegenden Spermatozoons gewählt werden (Boyers et al., 1989; Holt & Palomo, 1996). Bei zu klein gewähltem *search radius* können schnell bewegliche Objekte nicht verfolgt werden. Bei zu groß gewähltem Wert kann es zu irrtümlichen „Überspringen“ auf andere Spermatozoen kommen (Boyers et al., 1989; Holt & Palomo, 1996).

Die Grundeinstellung des Hobson Sperm Tracker für *threshold*, *filter weightings* und *search radius* wurde folgendermaßen durchgeführt: eine Zählkammer mit 20µm Tiefe (Weber Scientific International Ltd, Teddington, U.K.) wurde mit 10µl einer Spermatozoensuspension beschickt und auf den auf 37°C vorgewärmten Objektträgertisch gelegt. Unter Verwendung des x10 Objektivs wurde im Phasenkontrast die Bewegungsbahn der Spermatozoen auf dem Monitor beobachtet. Entsprechend den Herstellerangaben wurden die Werte für *thresholds* und *filter weightings* verändert und deren Einfluß auf das Erkennen der beweglichen Spermatozoen durch das System beobachtet. Entsprechend der Herstellerangaben, sollte der Kopf eines jeden Spermatozoen mit einem entsprechend großen Farbfleck bedeckt sein.

Ebenfalls unter Bildschirmkontrolle wurde der *search radius* eingestellt. Der Wert wurde so lange verändert, bis die Bewegungsbahn eines Spermatozoons kontinuierlich, ohne Unterbrechungen nachgezeichnet wurde und ohne auf die Bahn eines anderen dicht vorbei schwimmenden Spermatozoons überzuspringen.

immotile process

Mit den Einstellungen des *immotile process* werden die Kriterien vorgegeben, anhand denen das System immotile Objekte in immotile Spermatozoen und andere Objekte separiert. Dabei handelt es sich um einen Größenbereich, in dem Objekte liegen müssen, um als Spermatozoon erkannt zu werden sowie einer Verhältniszahl von längster zu kürzester Seite des Objektes. Aus diesen Werten errechnet der Hobson Sperm Tracker mit einem nicht näher beschriebenen *shape*-Algorithmus ob es sich bei einem immotilen Objekt um ein Spermatozoon handelt oder nicht. Diese Werte wurden ebenfalls unter Bildschirmkontrolle unter Beachtung der Untersuchungen von Morrell (1997b) eingestellt.

video enhancement

Hier wurden Helligkeit und Kontrast eingestellt. Die Lichtintensität der Mikroskopbeleuchtung wurde für alle Analysen durch Fixierung der Lichtregulierung standardisiert. Die optimalen Werte für Helligkeit und Kontrast wurden vom Hobson Sperm Tracker per Autofunktion vor jeder Analyse eingestellt.

minimum und maximum track time

Die *minimum track time* wurde mit 1 s, die *maximum track time* mit 2 s eingestellt. Damit wird eine Bewegungsspur über 1 s verfolgt und gemessen. Nur *tracks*, die länger als 1 s dauern, werden in die Analyse einbezogen, damit die Bewegung von immotilen Spermatozoen, die von motilen angestoßen werden, keinen Eingang in die Analyse finden. Nach Erreichen der *maximum track time* wird die Verfolgung der Spermatozoenbewegung abgebrochen. Die Einstellung von 2 s wurde gewählt, damit schnelle Spermatozoen nicht von der Analyse ausgeschlossen wurden.

Verwendete Einstellungen in Zahlen

<i>thresholds</i>	:+15
<i>filter weightings</i>	: Filter 1: 1
	Filter 2: -1
	Filter 3: 0
	Filter 4: 0
<i>search radius</i>	:10 µm

immotile process : maximale Größe : 10,0 µm

minimale Größe : 2,0 µm

ratio : 1,0

minimum track time : 1 s

maximum track time : 2 s

Durchführung der Messungen

Ein Aliquot einer Spermatozoensuspension wurde mit 37°C warmen Tyrodes-Laktat-Medium auf 5 Mio Spermatozoen pro ml verdünnt und für einige Zeit bei 37°C inkubiert. Eine Zählkammer mit 20 µm Tiefe (Weber Scientific International Ltd, Teddington, U.K.) wurde mit 10 µl dieser Verdünnung beschickt und auf den Objektträgertisch des Mikroskops gelegt. Unter Verwendung des x10 Objektivs wurde im Phasenkontrast die Analyse durchgeführt.

Vor jeder Analyse wurde die Helligkeit und der Kontrast mit der Autofunktion des Hobson Sperm Tracker optimiert. 300 Spermatozoenbahnen wurden analysiert. Es wurde in 8 Gesichtsfeldern gemessen (je vier Gesichtsfelder in 2 Zählkammern, die mit je 10 µl derselben Verdünnung beschickt wurden), um einen besseren Überblick über die Probe bezüglich des Anteils motiler Spermatozoen zu erhalten.

Von allen 8 Sequenzen wurden Videoaufnahmen als Referenz aufgenommen.

Gemessene Parameter

Motilität

Der prozentuale Teil motiler Spermatozoen an der Gesamtspermatozoenpopulation wurde bestimmt.

Kinematische Parameter

Folgende kinematische Parameter der Spermatozoenbeweglichkeit wurden ermittelt (Terminologie nach WHO Handbuch, 1992) (Abbildung 11):

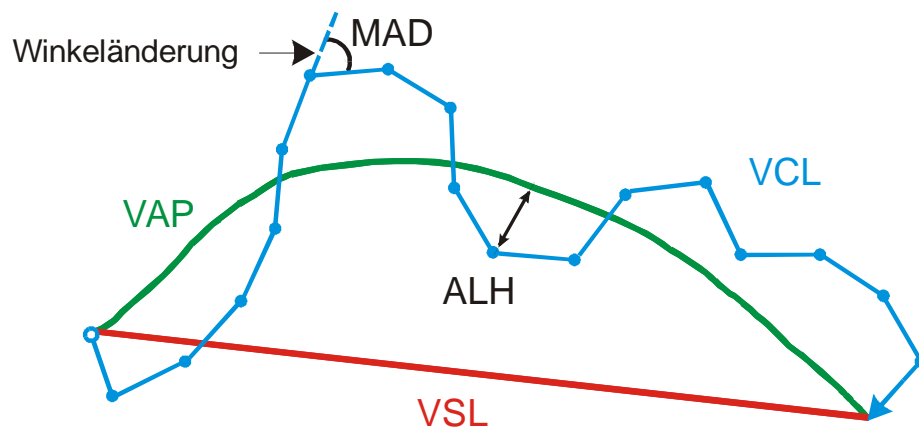


Abbildung 11: Kinematische Parameter der Spermatozoenbeweglichkeit nach WHO Handbuch (1992) und Hobson Sperm Tracker User Manual (1996)

VCL - *Curvilinear Velocity*, „Spurgeschwindigkeit“ ($\mu\text{m/s}$).

Mittlere Geschwindigkeit des Spermatozoenkopfes entlang der tatsächlichen kurvilinearen Bahn, wie sie sich in 2 Dimensionen unter dem Mikroskop darstellt.

VAP - *Average Path Velocity*, „Pfadgeschwindigkeit“ ($\mu\text{m/s}$).

Mittlere Geschwindigkeit des Spermatozoenkopfes längs seiner mittleren räumlichen Bahn. Dieser Bahnverlauf wird durch Glättung der tatsächlichen Bahn entsprechend dem Algorithmus des CASA-Instruments berechnet.

VSL - *Straight Line Velocity*, „Progressivgeschwindigkeit“ ($\mu\text{m/s}$).

Geschwindigkeit des Spermatozoenkopfes auf der angenommenen direkten Verbindung zwischen dem Start- und dem zuletzt bestimmten Punkt.

MAD - *Mean Angular Displacement*, „mittlere Richtungsabweichung“ (Grad°).

Mittlerer Wert für den Winkel der Richtungsänderung des Spermatozoenkopfes entlang der kurvilinearen Bahn.

BCF - *Beat Cross Frequency*, „Kopfschlagfrequenz“ (beats/s; Hz).

Die mittlere Rate pro Zeiteinheit, in der die kurvlineare Spermatozoenbahn den mittleren Weg kreuzt.

ALH - *Amplitude of Lateral Head Displacement*, „seitliche Kopfauslenkung“ (μm).
Größe der seitlichen Auslenkung des Spermatozoenkopfes vom mittleren Pfad aus berechnet.

LIN - *Linearity*, „Linearität“ (ohne Dimension).

Maß für die Gestrecktheit der kurvlinearen Bahn, VSL/VCL .

STR - *Straightness*, „Linearitätsindex“ (ohne Dimension).

Maß für die Gestrecktheit des gemittelten Weges, VSL/VAP .

3.3.2.4 Spermatozoenmorphologie

Beurteilung der Morphologie der Spermatozoen

Die Beurteilung der Morphologie der Spermatozoen wurde entsprechend den Angaben im WHO Handbuch (1992) durchgeführt.

Dazu wurden auf fettfreien Objektträgern Ausstriche der Spermatozoensuspension angefertigt. Die Spermatozoensuspension wurde vorher so weit verdünnt, dass die Spermatozoen auf den Ausstrichen einzeln lagen. Die Ausstriche wurden luftgetrocknet und mit einem Ethanol (95%ig)/Ether-Gemisch fixiert.

Die Ausstriche wurden mit der für Spermatozoen modifizierten Papanicolaou-Färbung gefärbt (WHO, 1992) und mit „DPX Mountant for histology“ (Fluka Chemie AG) eingebettet.

Bei Papanicolaou-gefärbten Spermatozoen erscheint das Akrosom hellblau, die postakrosomale Region dunkelblau. Das Mittelstück kann eine gewisse Rotfärbung aufweisen. Der Schwanz ist ebenfalls blau gefärbt (WHO, 1987).

Unter Verwendung des Olympus BH2 Mikroskops wurden die Spermatozoen im Hellfeld bei 600facher Vergrößerung mit Ölimmersion betrachtet. Zur Unterstützung der Beurteilung wurden die Spermatozoen zusätzlich auf dem Monitor des Hobson Sperm Tracker betrachtet.

Pro Ejakulat wurden 200 Spermatozoen beurteilt.

Die morphologische Klassifizierung der Spermatozoen erfolgte nach folgenden Kriterien (WHO, 1992):

a) Abnorme Form und/oder Größe des Spermatozookopfes:

große, kleine, zigarrenförmige, birnenförmige und amorphe Köpfe und solche mit Vakuolen (d.h. >20% der Kopffläche werden von nicht angefärbten Vakuolen eingenommen) sowie Doppelköpfe bzw. jede Kombination dieser Anomalien.

b) Defekte des Hals- und Mittelstücks:

inklusive Fehlen des Schwanzes (einzeln liegende Spermatozooköpfe), nicht regulär ansetzender oder „geknickter“ Schwanz (definiert als Winkel von etwa 90° zwischen Spermatozoenschwanz und Längsachse des Kopfes), erweitertes, unregelmäßig geformtes, geknicktes oder abnorm dünnes Mittelstück und jede Kombination dieser Defekte.

c) Schwanzdefekte:

kurze, haarnadelförmige, gebrochene (Winkel >90°) oder aufgerollte Schwänze sowie Doppel- und Mehrfachschwänze und solche mit unregelmäßiger Breite bzw. Kombination dieser Defekte.

d) Zytoplasmatropfen

die größer als ein Drittel eines normalen Spermatozookopfes sind.

Vermessung der Spermatozoen/Spermatozoenmorphometrie

Geräte

Die Vermessung der Spermatozoen wurde mit dem Hobson Sperm Tracker durchgeführt unter Verwendung der Hobson Morphology Software (Hobson Tracking Systems LTD., Sheffield, U.K.). Es wurde der gleiche Geräteaufbau wie in Kapitel 3.3.2.3 beschrieben verwendet. Der Tracker Monitor sowie der beheizbare Objektträgertisch waren dabei nicht nötig.

Das Programm digitalisiert das von der Videokamera gelieferte Bild. Anhand von Grauwertstufen erkennt das Programm Objekte und markiert deren Rand mit Vermessungspunkten und legt ein Koordinatenkreuz darüber (Abbildung 12). Gleichzeitig wird die Insertionsstelle des Spermatozoenschwanzes bestimmt und danach die Längsachse des jetzt als Spermatozoons erkannten Objektes festgelegt. Die Kopflänge und –breite des Spermatozoons wird automatisch gemessen sowie das Verhältnis Kopflänge zu Kopfbreite (L/B) berechnet.

Bei sehr gutem Kontrast ist das Programm auch in der Lage die Länge des Spermatozoenschwanzes zu messen. Falls diese Messung nicht funktioniert, bestand die Möglichkeit mit Hilfe des *curser*s und der Maus den Schwanz von Hand auf dem Bildschirm abzufahren, um so die Länge zu messen.

Mit vom Hersteller fest vorgegebenen Algorithmen kategorisiert das Programm anhand der Objektgröße, der Grauwertstufen und des Kopfumrisses die gemessenen Spermatozoen in normale und morphologisch veränderte Spermatozoen. Da diese Algorithmen für die Beurteilung von humanen Spermatozoen entwickelt wurden, ist dieses Programm nicht geeignet, die Spermatozoen von Primaten zu beurteilen. Es stellt aber eine elegante und schnelle Methode dar, Spermatozoen zu vermessen.

Durchführung der Messungen

Auch hier mußte zunächst die Bildvergrößerung mit dem System kalibriert werden. Dies wurde wiederum mittels *Calibration*-Funktion und der Graduierung einer Zählkammer durchgeführt.

Es wurden die Papanicolaou-gefärbten Spermatozoenausstriche verwendet. Die Ausstriche wurden im Hellfeld mit einem x60 Objektiv mit Ölimmersion betrachtet.

Vor jeder Messung wurde die Helligkeit und der Kontrast mit der *imaging*-Funktion standardisiert und optimiert.

Für jede der drei Krallenaffenpezies wurden von jeweils sechs Tieren 200 Spermatozoen pro Tier vermessen. Es wurde die Länge und Breite der Spermatozoenköpfe sowie die Schwanzlänge bestimmt. Das Verhältnis Kopflänge zu Kopfbreite sowie die Gesamtlänge der Spermatozoen wurden berechnet.

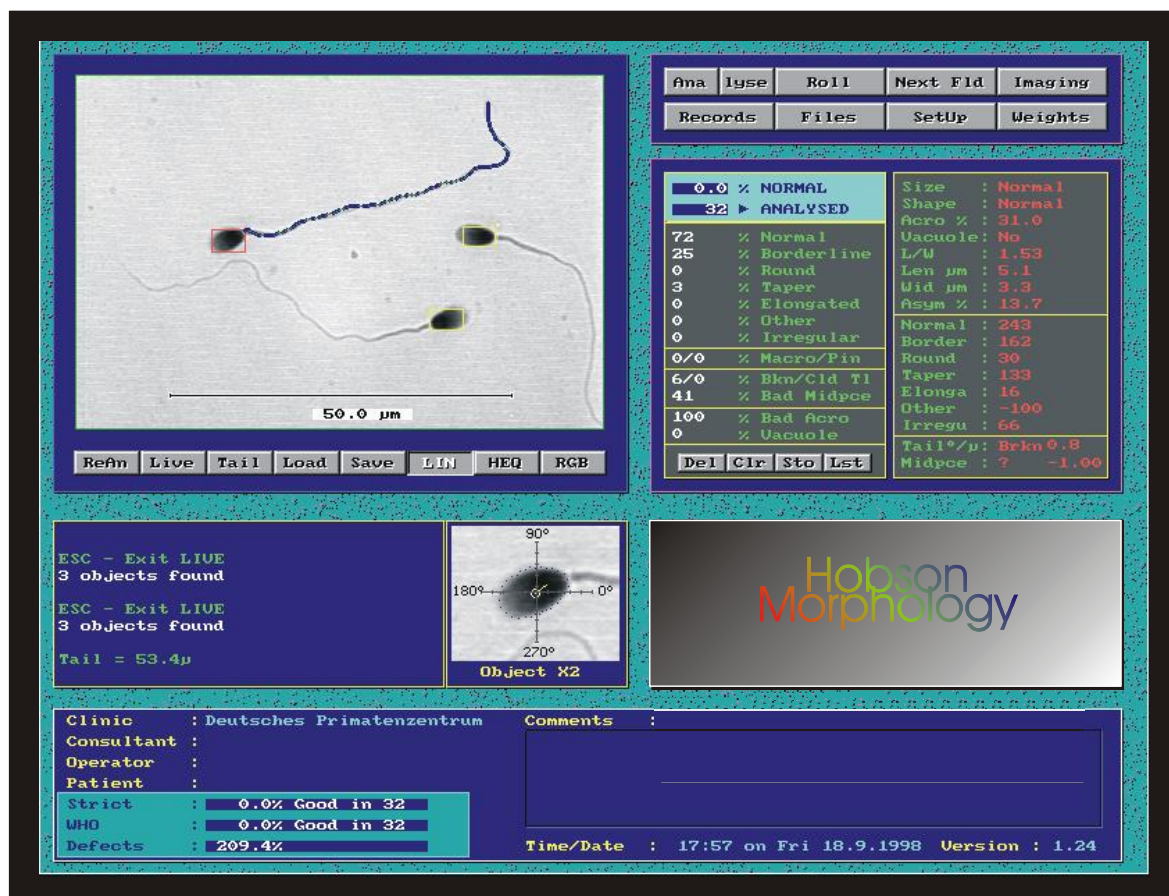


Abbildung 12: Bildschirmmaske des Hobson Morphology Programms

3.4 Statistik

Die Analyse der Daten wurde mit SIGMA STAT, Version 3,0 (Jandel Scientific) durchgeführt.

Der Vergleich der Ejakulatparameter von Ejakulaten, die mittels PVS und RPE gewonnen wurden, wurde mittels Varianzanalyse mit Messwertwiederholung (ANOVA) unter Verwendung von STATISTICA, Version 5,0 (StatSoft, Inc.) durchgeführt.

Bei den in dieser Arbeit angegebenen Mittelwerten handelt es sich um den arithmetischen Mittelwert \pm der Standardabweichung. In einigen Fällen wäre die Berechnung des geometrischen Mittelwertes geeigneter gewesen, da die Daten eine schiefe Verteilung zeigen.

Fast ausnahmslos wurde in der die Ejakulatuntersuchung von Primaten betreffenden Literatur der arithmetische Mittelwert angegeben, obwohl auch die dort angeführten Werte eine schiefe Verteilung vermuten lassen. Um Vergleiche mit diesen Veröffentlichungen zuzulassen, wurde daher auch in dieser Arbeit dem arithmetischen Mittelwert der Vorzug gegeben.

4. Ergebnisse

4.1 Elektroejakulation

4.1.1 Reaktion der Tiere

Bei allen Versuchsserien erfolgte die Emission des Ejakulates nicht in einem Erguß, sondern in sehr kleinen, schwer aufzufangenden Tropfen.

Insbesondere bei den Versuchen, bei denen Ketamin als Narkotikum eingesetzt wurde, trat vor dem eigentlichen Ejakulat häufig ein klares, fadenziehendes, spermatozoenfreies Sekret auf.

Die Ejakulation war weitgehend unabhängig vom Grad der Erektion des Penis. Allerdings war eine einsetzende Erektion eine gute Richtschnur, um die optimale Position der Sonde für eine adäquate Stimulation aufzufinden. Eine vollständige Erektion wurde nur in der Minderzahl der Fälle beobachtet.

Die meisten Ejakulate enthielten ein mehr oder weniger ausgeprägtes Koagulum. Das Koagulum trat in Form von gallertigen Massen oder Flocken auf. Bei einigen Ejakulaten war das Koagulum sehr stark ausgeprägt. In diesen Fällen konnten auch nach der Inkubation in Medium keine freien Spermatozoen gewonnen werden.

4.1.2 Erfolgsquoten der RPE

4.1.2.1 *Callithrix jacchus*

Versuchsprotokoll 1:

(SaffanTM/ *Stimulationsprotokoll a/ Rektalsonde mit Ringelektroden, nach Cui et al., 1991*)

Mit sechs Tieren wurde eine unterschiedliche Anzahl von Versuchen durchgeführt. Insgesamt wurden 27 Versuche durchgeführt. Von nur zwei Tieren konnten insgesamt zehn Ejakulate gewonnen werden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Erfolgsquote der RPE bei *C. jacchus* mit Versuchsprotokoll 1

Tiernummer	Anzahl Versuche	Anzahl gewonnener Ejakulate
5882	1	0
6253	4	0
7514	2	0
7160	6	0
7407	5	4
6907	9	6
Summe	27	10

Versuchsprotokoll 2:

(Saffan™/ *Stimulationsprotokoll a/ Rektalsonden mit Längselektroden*)

Mit sechs Tieren wurde ebenfalls eine unterschiedliche Anzahl von Versuchen durchgeführt. In insgesamt 22 Versuchen wurden von drei Tieren sieben Ejakulate gewonnen (Tabelle 2).

Tabelle 2: Erfolgsquote der RPE bei *C. jacchus* mit Versuchsprotokoll 2

Tiernummer	Anzahl Versuche	Anzahl gewonnener Ejakulate
6253	4	0
7514	4	0
7407	5	2
6996	1	0
5793	4	3
6854	4	2
Summe	22	7

Die Handhabung der Sonden mit Längselektroden (Sonden d und e) erwies sich als schwieriger als die der Sonden a, b (mit Ringelektroden) und c (mit Kupferschaft und Kupferspitze). Die Ausrichtung der auf einer Seite der Sonde angeordneten Elektroden auf den Bereich der akzessorischen Geschlechtsdrüsen reduzierte die somatische Reaktion der Tiere (Kontraktion der Muskulatur der Hintergliedmaßen) beträchtlich. Allerdings war die Beibehaltung der Ausrichtung der Elektroden bei den kleinen Tieren ausgesprochen schwierig. Auch wurden durchschnittlich höhere Spannungen benötigt, um ein Ejakulat zu gewinnen (siehe Tabelle 7).

Versuchsprotokoll 3:

(Ketamin/ Stimulationsprotokoll a/ Sonde c mit Schaft und Spitze aus Kupfer)

Mit vier Tieren wurden insgesamt zehn Versuche durchgeführt. Es wurden sechs Ejakulate gewonnen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Erfolgsquote der RPE bei *C. jacchus* mit Versuchsprotokoll 3

Tiernummer	Anzahl Versuche	Anzahl gewonnener Ejakulate
6768	3	2
6996	3	1
5793	2	2
6854	2	1
Summe	10	6

Versuchsprotokoll 4:

(Ketamin/ Stimulationsprotokoll b (an/aus)/ Sonde c mit Schaft und Spitze aus Kupfer))

Mit fünf Tieren wurden insgesamt elf Versuche durchgeführt. Sechs Ejakulate konnten von vier Tieren gewonnen werden (Tabelle 4).

Tabelle 4: Erfolgsquote der RPE bei *C. jacchus* mit Versuchsprotokoll 4

Tiernummer	Anzahl Versuche	Anzahl gewonnener Ejakulate
5882	3	0
6768	3	2
6996	2	2
5793	1	1
6854	2	1
Summe	11	6

Die Verwendung der Sonde c war vorteilhaft. Durch die Anordnung der Elektroden war die Führung der Sonde wesentlich erleichtert. Die Positionierung der Sonde im Rektum war dabei nicht so stark an die Einhaltung einer bestimmten Position gebunden.

Die Narkose mit Ketamin war dagegen mit einigen Nachteilen verbunden. Die Tiere krampften stark. Auch war die Narkosetiefe für die Durchführung der RPE nicht ausreichend. Darüber hinaus wurde nach 10-15 Minuten wieder ein Narkosestadium

erreicht, in dem eine RPE nicht mehr durchführbar war. Trotzdem war die Nachschlafphase im Vergleich zur Narkose unter Verwendung von Saffan™ sehr lang.

Versuchsprotokoll 5:

(Saffan™/ Stimulationsprotokoll b (an/aus)/ Sonde c mit Schaft und Spitze aus Kupfer)

Mit fünf Tieren wurden insgesamt 18 Versuche durchgeführt. Dabei konnten insgesamt 17 Ejakulate gewonnen werden (Tabelle 5).

Tabelle 5: Erfolgsquote der RPE bei *C. jacchus* mit Versuchsprotokoll 5

Tiernummer	Anzahl Versuche	Anzahl gewonnener Ejakulate
5882	6	6
6768	4	3
6996	4	4
5793	3	3
6907	1	1
Summe	18	17

Anders als bei den obigen Versuchsprotokollen, erfolgte die Ejektion des Ejakulates in größeren Fraktionen und war schneller abgeschlossen. Die Narkose mit Saffan™ war optimal für die Durchführung der RPE und zeichnete sich durch eine schnelle Erholung der Tiere aus. Wie schon an obiger Stelle erwähnt, war die Stimulation durch die besondere Geometrie der Sonde c wesentlich leichter durchzuführen als mit allen anderen Rektalsonden.

Zusammenfassung der Erfolgsquoten der fünf Versuchsprotokolle bei *C. jacchus*

Tabelle 6 zeigt eine Zusammenfassung der Erfolgsquoten, die mit verschiedenen RPE-Methoden erzielt wurden. Berücksichtigt ist zusätzlich die Häufigkeit des Auftretens von Ejakulaten ohne Spermatozoen oder mit nur einzelnen Spermatozoen, Urinkontamination und Ejakulate ohne freie Spermatozoen.

Tabelle 6: Zusammenfassung der Erfolgsquoten der RPE - Versuche bei *C. jacchus*

Versuchsprotokoll	1	2	3	4	5
Anzahl Versuche	27	22	10	11	18
gewonnene Ejakulate	10	7	6	6	17
ohne Spermatozoen	1	2	0	0	0
mit einzelnen Spermatozoen	3	2	2	3	1
urinkontaminierte Ejakulate	0	0	0	0	1
ohne freie Spermatozoen	0	2	1	1	3
vollständige Analyse möglich	6	1	3	2	12

Durchschnittliche Stimulationsdauer und benötigte elektrische Spannung der verschiedenen Versuchsprotokolle bei *C. jacchus*

Um einen Eindruck über die Belastung der Tiere bei den verschiedenen Versuchsprotokollen zu erlangen, sind in Tabelle 7 die durchschnittliche Anzahl Einzelstimulationen (a) und die durchschnittliche Spannung (b), die benötigt wurde um eine Ejakulation herbeizuführen, dargestellt. Ebenso ist die durchschnittliche Dauer der Gesamtstimulation (c) sowie die durchschnittliche Gesamtdauer (Summe der Dauer der Einzelstimulationen) der angelegten Spannung (d) dargestellt.

Tabelle. 7: Dauer der Stimulation und Spannung der RPE bei *C. jacchus*

Versuchsprotokoll	1	2	3	4	5
a) Anzahl Stimulationen	24,4 (10-40)	30 (10-50)	19,2 (10-30)	14 (10-19)	11 (6-27)
b) Spannung (V)	5,5 (4-7)	6 (4-8)	5 (4-6)	7,3 (7-8)	7,1 (7-8)
c) Dauer (s)	293 (120-480)	360 (120-600)	230 (120-360)	196 (140-280)	154 (84-378)
d) Dauer Strom (s)	171 (70-280)	210 (70-350)	134 (70-210)	28 (20-40)	22 (12-54)
Mittelwert (Bereich)					

- a) durchschnittliche Anzahl von Stimulationen, die benötigt wurden bis eine Ejakulation erfolgte.
- b) durchschnittliche Spannung (V) bei der eine Ejakulation erfolgte
- c) durchschnittliche Dauer (s) der Gesamtstimulation bis zur Ejakulation
- d) durchschnittliche Gesamtdauer (s) der angelegten Spannung bis zur Ejakulation

4.1.2.2 *Saguinus fuscicollis*

Versuchsprotokoll 1:

(Saffan™/ *Stimulationsprotokoll a/ Rektalsonde mit Ringelektroden, nach Cui et al., 1991*)

Mit sieben Tieren wurden insgesamt 52 Versuche durchgeführt. Mit Ausnahme eines Tieres (8250) wurden von den restlichen sechs Männchen insgesamt 38 Ejakulate gewonnen.

Tabelle 8: Erfolgsquote der RPE bei *S. fuscicollis* mit Versuchsprotokoll 1

Tier	Anzahl Versuche	Anzahl gewonnener Ejakulate
8250	6	0
8172	8	6
7815	8	7
8249	9	7
372	6	6
7235	7	7
5381	8	5
Summe	52	38

Mit *S. fuscicollis* waren aus Gründen des Kolonimanagements nur Versuche nach Versuchsprotokoll 1 möglich.

Zusammenfassung der Erfolgsquote der Versuche bei *S. fuscicollis*

Tabelle 9 zeigt noch einmal die Erfolgsquote des Versuchsprotokoll 1 bei *S. fuscicollis* unter Berücksichtigung des Auftretens von Ejakulaten ohne Spermatozoen oder mit nur einzelnen Spermatozoen, Urinkontamination sowie Ejakulate ohne freie Spermatozoen.

Tabelle 9: Erfolgsquoten der RPE - Versuche bei *S. fuscicollis*

Versuchsprotokoll	1
Anzahl Versuche	52
gewonnene Ejakulate	38
ohne Spermatozoen	2
mit einzelnen Spermatozoen	1
urinkontaminierte Ejakulate	5
ohne freie Spermatozoen	1
ohne motile Spermatozoen	4
vollständige Analyse möglich	25

Durchschnittliche Stimulationsdauer und benötigte elektrische Spannung der RPE- Versuche bei *S. fuscicollis*

Auch für *S. fuscicollis* erfolgt in Tabelle 10 eine Darstellung der durchschnittlich benötigten Anzahl von Einzelstimulationen (a) und der durchschnittlich benötigten Spannung (b), sowie der durchschnittlichen Dauer der Gesamtprozedur (c) und der durchschnittlichen Gesamtdauer (Summe der Dauer der Einzelstimulationen) der angelegten Spannung (d).

Tabelle 10: Dauer der Stimulation und Spannung der RPE bei *S. fuscicollis*

Versuchsprotokoll	1
a) Anzahl Stimulationen	17,1 (5-40)
b) Spannung (V)	4,9 (4-7)
c) Dauer (s)	204,6 (60-480)
d) Dauer Strom (s)	119,4 (35-280)
Mittelwert (Bereich)	

- a) durchschnittliche Anzahl von Stimulationen, die benötigt wurden bis eine Ejakulation erfolgte.
- b) durchschnittliche Spannung (V) bei der eine Ejakulation erfolgte
- c) durchschnittliche Dauer (s) der Gesamtstimulation bis zur Ejakulation
- d) durchschnittliche Gesamtdauer (s) der angelegten Spannung bis zur Ejakulation

4.1.2.3 *Saguinus oedipus*

Versuchsprotokoll 1:

(Saffan™/ *Stimulationsprotokoll a/ Rektalsonde mit Ringelektroden, nach Cui et al., 1991*)

Mit sechs Tieren wurden insgesamt 28 Versuche durchgeführt. Dabei konnten von vier Tieren insgesamt sieben Ejakulate gewonnen werden.

Tabelle 11: Erfolgsquote der RPE bei *S. oedipus* mit Versuchsprotokoll 1

Tier	Anzahl Versuche	Anzahl gewonnener Ejakulate
8471	6	3
7900	5	1
7296	5	2
8814	2	0
8522	5	1
8553	5	0
Summe	28	7

Versuchsprotokoll 5:

(Saffan™/ *Stimulationsprotokoll b (an/aus)/ Sonde c mit Schaft und Spitze aus Kupfer*)

Mit den gleichen Tieren wie oben beschrieben wurden 25 weiteren Versuche durchgeführt. Dabei wurden 24 Ejakulate gewonnen.

Tabelle 12: Erfolgsquote der RPE bei *S. oedipus* mit Versuchsprotokoll 5

Tier	Anzahl Versuche	Anzahl gewonnener Ejakulate
8471	2	2
7900	5	5
7296	4	3
8814	5	5
8522	4	4
8553	5	5
Summe	25	24

Zusammenfassung der Erfolgsquoten der zwei Versuchsprotokolle bei *S. oedipus*

Tabelle 13 faßt die erzielten Erfolgsquoten bei der RPE von *S. oedipus* zusammen. Berücksichtigt werden ebenfalls die Häufigkeit des Auftretens von Ejakulaten ohne Spermatozoen oder mit nur einzelnen Spermatozoen, Urinkontamination und Ejakulate ohne freie Spermatozoen.

Tabelle 13: Zusammenfassung der Erfolgsquoten der RPE - Versuche bei *S. oedipus*

Versuchsprotokoll	1	5
Anzahl Versuche	28	25
gewonnene Ejakulate	7	24
ohne Spermatozoen	0	0
mit einzelnen Spermatozoen	1	0
urinkontaminierte Ejakulate	0	0
ohne freie Spermatozoen	3	2
vollständige Analyse möglich	3	22

Durchschnittliche Stimulationsdauer und benötigte elektrische Spannung der zwei Versuchsprotokolle bei *S. oedipus*

Tabelle 14: Dauer der Stimulation und Spannung der RPE bei *S. oedipus*

Versuchsserie	1	5
a) Anzahl Stimulationen	35,7 (10-50)	13,5 (6-25)
b) Spannung (V)	6,7 (4-8)	7,3 (7-8)
c) Dauer (s)	429 (120-600)	189 (84-350)
d) Dauer Strom (s)	250 (70-350)	27 (12-50)
		Mittelwert (Bereich)

- a) durchschnittliche Anzahl von Stimulationen, die benötigt wurden bis eine Ejakulation erfolgte.
- b) durchschnittliche Spannung (V) bei der eine Ejakulation erfolgte
- c) durchschnittliche Dauer (s) der Gesamtstimulation bis zur Ejakulation
- d) durchschnittliche Gesamtdauer (s) der angelegten Spannung bis zur Ejakulation

4.1.3 Analyse der mittels RPE gewonnenen Ejakulate der drei Spezies *C. jacchus*, *S. fuscicollis* und *S. oedipus*

Nicht alle gewonnenen Ejakulate konnten vollständig analysiert werden. Das hatte mehrere Gründe. Zum einen enthielten einige Ejakulate keine oder nur einzelne Spermatozoen, einzelne Ejakulate waren mit Urin kontaminiert und bei einer Reihe von Ejakulaten blieben alle Spermatozoen im Koagulum eingeschlossen, sodass keine freien, nutzbaren Spermatozoen gewonnen werden konnten.

In den folgenden Darstellungen der Ejakulatcharakteristika der drei Krallenaffenspezies wurden nur Ejakulate berücksichtigt, mit denen eine vollständige Analyse durchgeführt werden konnte. Hierbei wurde nicht unterschieden, mit welcher RPE-Methode das Ejakulat gewonnen wurde.

Von *C. jacchus* wurden insgesamt 24 Ejakulate analysiert, jeweils vier Ejakulate von sechs Tieren. Von *S. fuscicollis* wurden insgesamt 25 Ejakulate analysiert. Drei bis sieben brauchbare Ejakulate konnten von fünf Tieren gewonnen werden. Von *S.*

oedipus wurden ebenfalls 25 Ejakulate analysiert, jeweils fünf Ejakulate von fünf verschiedenen Tieren.

4.1.3.1 Makroskopische Ejakulatuntersuchung

a) Allgemein

Alle Ejakulate der drei Spezies enthielten ein Koagulum. Das Koagulum konnte das gesamte Ejakulat erfassen, ohne dass eine flüssige Fraktion vorlag. In diesen Fällen bestand das Ejakulat aus klaren bis opaken gallertigen Klumpen. Manche Ejakulate waren makroskopisch flüssig und ohne erkennbare feste Bestandteile. Mikroskopisch konnten aber in diesen Fällen allerdings immer durchsichtige Flocken beobachtet werden. Zwischen diesen beiden Koagulumformen kamen alle Übergangsformen vor. Die Farbe des Ejakulates variierte je nach Spermatozoenkonzentration von weißlich–opak bis gelblich–weiß.

Aus Ejakulaten, die gänzlich vom Koagulum erfaßt wurden, konnten in der Regel weder nach Inkubation in Medium noch durch mechanisches Suspendieren im Medium freie Spermatozoen gewonnen werden.

Hinsichtlich der Beschaffenheit des Koagulums gab es zwischen den drei Spezies keine Unterschiede. Alle Formen des Koagulums konnten bei allen drei Spezies gefunden werden. Bei den einzelnen Individuen konnte jedoch eine Neigung zum einen oder anderen Ende des Koagulumspektrums beobachtet werden.

b) Ejakulatvolumen und -gewicht

Bei allen drei Spezies waren die Ejakulatvolumen sehr klein. Bei *C. jacchus* betrug das Volumen im Durchschnitt 38,1 µl, bei *S. fuscicollis* 18,1 µl, bei *S. oedipus* 39,9 µl. Abbildung 13 zeigt die Gesamtmittelwerte aller Ejakulate für jede Spezies sowie das mittlere Volumen für jedes Einzeltier. Im Anhang finden sich diese Werte in Tabellenform. Die intra- und interindividuelle Variabilität war bei allen drei Spezies sehr hoch. Das gleiche gilt für die Ejakulatgewichte (Abbildung 14).

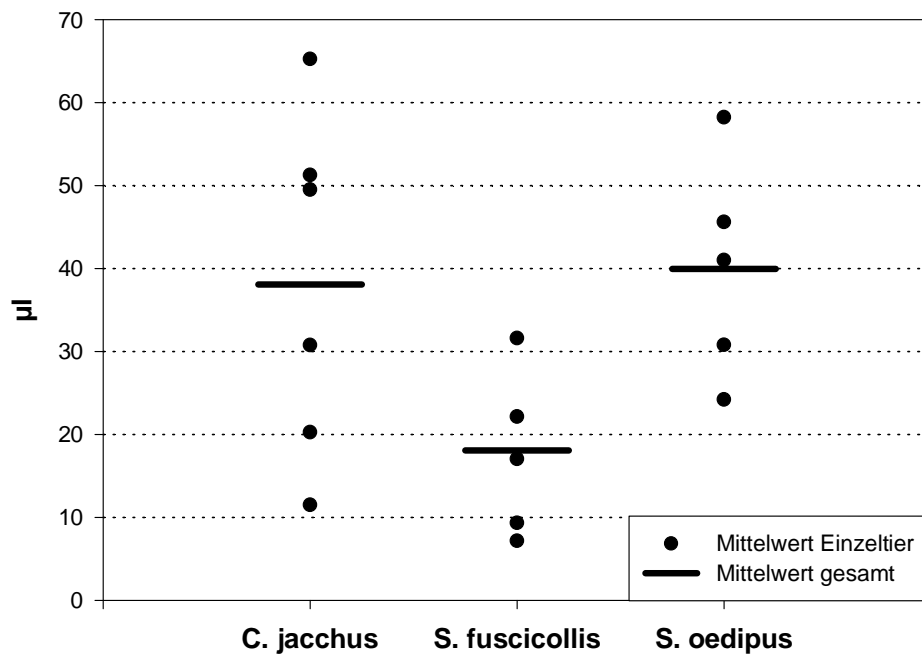


Abbildung 13: Dargestellt sind die Mittelwerte der Ejakulatvolumen (µl) für jedes Einzeltier (Punkte) sowie der Gesamtmittelwert für jede Spezies (Balken). Von *C. jacchus* wurden 24 Ejakulate von 6 Tieren analysiert, von *S. fuscicollis* 25 Ejakulate von 5 Tieren, von *S. oedipus* 25 Ejakulate von 5 Tieren.

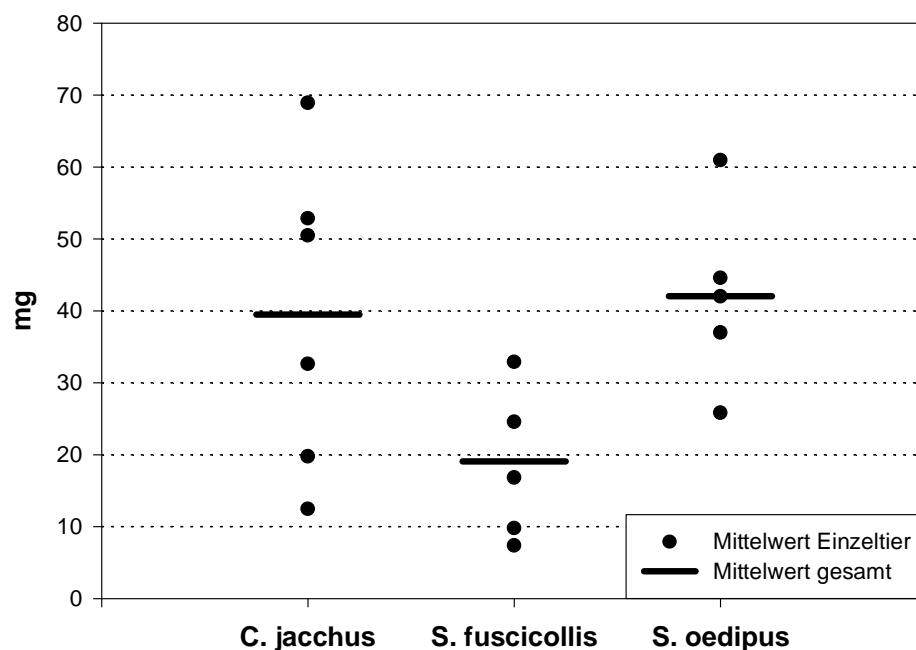


Abbildung 14: Dargestellt sind die Mittelwerte der Ejakulatgewichte (mg) für jedes Einzeltier (Punkte) sowie der Gesamtmittelwert für jede Spezies (Balken). Von *C. jacchus* wurden 24 Ejakulate von 6 Tieren analysiert, von *S. fuscicollis* 25 Ejakulate von 5 Tieren, von *S. oedipus* 25 Ejakulate von 5 Tieren.

4.1.3.2 Mikroskopische Ejakulatuntersuchung

a) Spermatozoenkonzentration und Anzahl Spermatozoen pro Ejakulat

Bei beiden Parametern war bei allen drei Spezies eine ausgesprochen hohe intra- und interindividuelle Variabilität zu verzeichnen.

Die Spermatozoenkonzentration betrug bei *C. jacchus* im Durchschnitt $130,2 \times 10^6$ /ml mit einer Standardabweichung von $254,3 \times 10^6$. Die durchschnittliche Anzahl Spermatozoen pro Ejakulat betrug $3,5 \pm 5,2 \times 10^6$.

Bei *S. fuscicollis* betrug die Spermatozoenkonzentration $472,3 \times 10^6$ /ml $\pm 445,6 \times 10^6$, die Anzahl Spermatozoen pro Ejakulat $11,2 \pm 23,1 \times 10^6$.

Bei *S. oedipus* waren die Werte $185,3 \pm 131,4 \times 10^6$ /ml für die Spermatozoenkonzentration und $7,9 \pm 7,6 \times 10^6$ für die Anzahl Spermatozoen pro Ejakulat.

In den Abbildungen 15 und 16 sind die Spermatozoenkonzentration und die Anzahl Spermatozoen pro Ejakulat dargestellt. Im Anhang finden sich die Zahlenwerte zu den Einzeltieren.

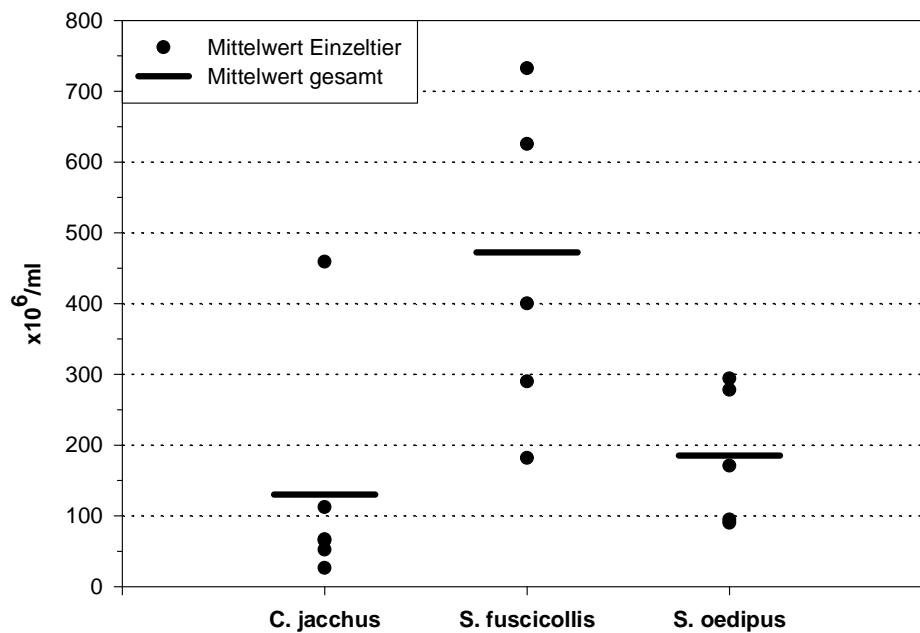


Abbildung 15: Dargestellt sind die Mittelwerte der Spermatozoenkonzentration ($\times 10^6/\text{ml}$) für jedes Einzeltier (Punkte) sowie der Gesamtmittelwert für jede Spezies (Balken). Von *C. jacchus* wurden 24 Ejakulate von 6 Tieren analysiert, von *S. fuscicollis* 25 Ejakulate von 5 Tieren, von *S. oedipus* 25 Ejakulate von 5 Tieren.

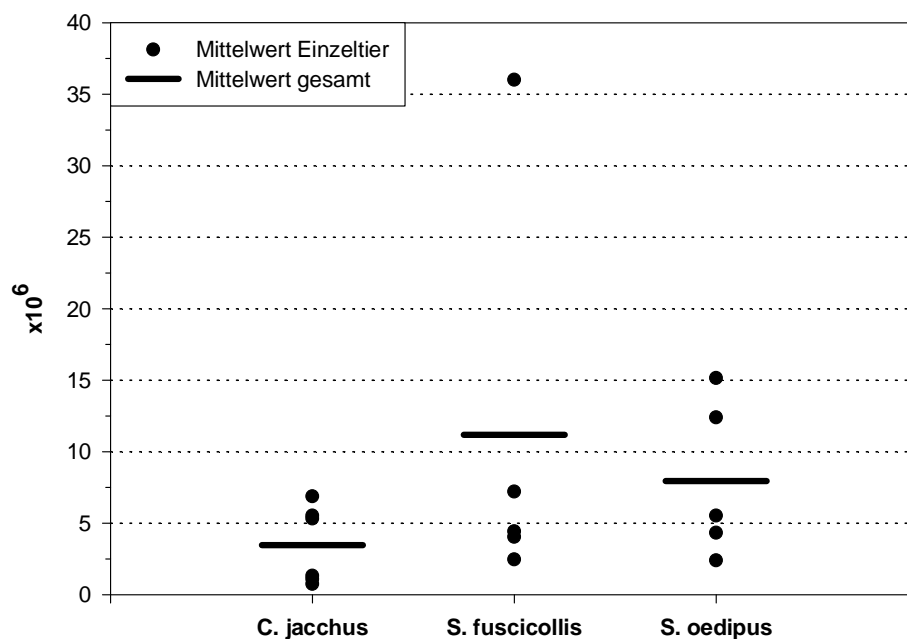


Abbildung 16: Dargestellt sind die Mittelwerte der Anzahl Spermatozoen pro Ejakulat ($\times 10^6$) für jedes Einzeltier (Punkte) sowie der Gesamtmittelwert für jede Spezies (Balken). Von *C. jacchus* wurden 24 Ejakulate von 6 Tieren analysiert, von *S. fuscicollis* 25 Ejakulate von 5 Tieren, von *S. oedipus* 25 Ejakulate von 5 Tieren.

b) Anteil lebender und motiler Spermatozoen

In Abbildung 17 ist der Anteil lebender und motiler Spermatozoen dargestellt.

Im Durchschnitt war bei allen drei Spezies ein hoher Anteil lebender und motiler Spermatozoen vorhanden. Allerdings traten bei allen drei Spezies immer wieder einzelne Ejakulate auf, mit einem sehr geringen Anteil lebender und auch motiler Spermatozoen.

Die Ejakulate von *C. jacchus* enthielten im Schnitt 60,9% \pm 15,5% lebende und 42,2% \pm 17,7% motile Spermatozoen.

Bei *S. fuscicollis* waren 71,1% \pm 13,8% der Spermatozoen lebend und 55,7% \pm 22,7% motil.

Bei *S. oedipus* waren dies 75,3% \pm 13,3% lebende und 61,4% \pm 17,5% für die Motilität.

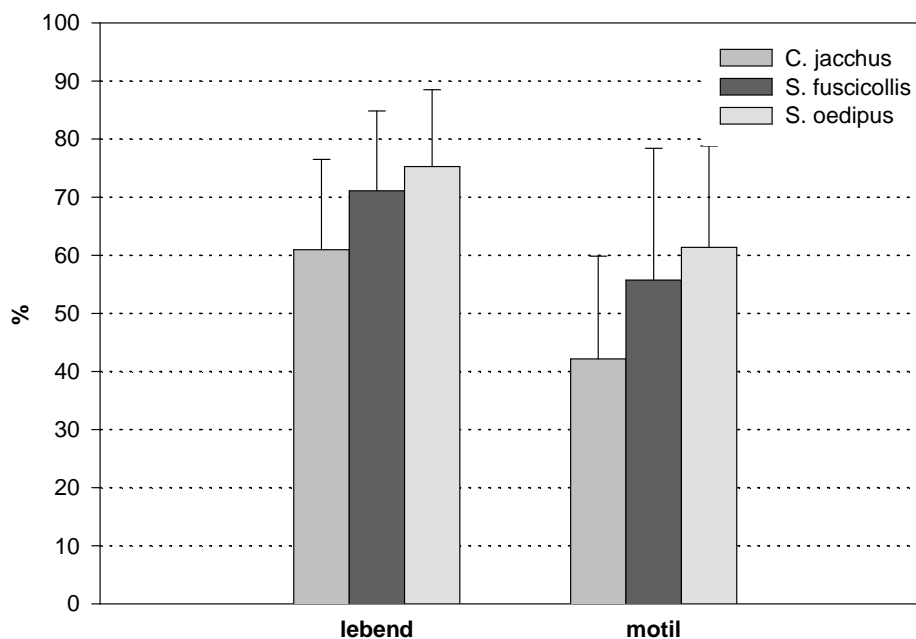


Abbildung 17: Prozentualer Anteil lebender und motiler Spermatozoen

c) Kinematische Parameter

In Tabelle 15 sind die Mittelwerte der kinematischen Parameter der Spermatozoen der drei Krallenaffenspezies dargestellt (siehe Abbildung 11, Seite 43).

Tabelle 15: Kinematische Parameter der Spermatozoen der drei Krallenaffenspezies

	<i>C. jacchus</i>	<i>S. fuscicollis</i>	<i>S. oedipus</i>
VCL (µm/s)	147,0 ± 20,8	140,6 ± 23,6	170,1 ± 25,7
VAP (µm/s)	108,1 ± 20,1	96,5 ± 21,9	111,4 ± 29,5
VSL (µm/s)	66,6 ± 19,5	57,1 ± 17,4	75,6 ± 29,0
LIN (%)	38,6 ± 10,2	36,0 ± 8,1	39,0 ± 12,6
STR (%)	54,3 ± 11,1	54,7 ± 6,8	60,3 ± 9,0
MAD (°)	41,3 ± 8,7	42,1 ± 7,9	46,7 ± 12,9
BCF (Hz)	9,2 ± 3,6	9,9 ± 4,8	14,7 ± 3,9
ALH (µm)	7,0 ± 2,2	8,8 ± 5,9	6,6 ± 1,3

Mittelwerte ± Standardabweichung

C. jacchus : 24 Ejakulate von 6 Tieren und 300 Spermatozoenbahnen pro Ejakulat wurden analysiert

S. fuscicollis: 25 Ejakulate von 5 Tieren und 300 Spermatozoenbahnen pro Ejakulat wurden analysiert

S. oedipus : 25 Ejakulate von 5 Tieren und 300 Spermatozoenbahnen pro Ejakulat wurden analysiert

Die Abbildungen 18 a-c zeigen Populationshistogramme der kinematischen Parameter *Curvilinear Velocity* (VCL), *Straight Line Velocity* (VSL) und *Linearity* (LIN).

Die Daten für die Histogramme wurden durch die Analyse von 24 Ejakulaten von 6 Tieren für *C. jacchus*, 25 Ejakulate von 5 Tieren für *S. fuscicollis* und 25 Ejakulate von 5 Tieren für *S. oedipus* erhalten (siehe auch Anhang). Um die Histogramme zu erstellen, wurden die Daten aller Ejakulate der jeweiligen Spezies zusammengefasst.

Die Verteilungsmuster waren bei allen drei Spezies ähnlich. Spermatozoen von *S. oedipus* erreichten im Parameter VCL eine höhere Maximalgeschwindigkeit als Spermatozoen der beiden anderen Spezies. Im Parameter VCL wurden bei allen drei Spezies zwei Populationen von schnell und langsam schwimmenden Spermatozoen gefunden.

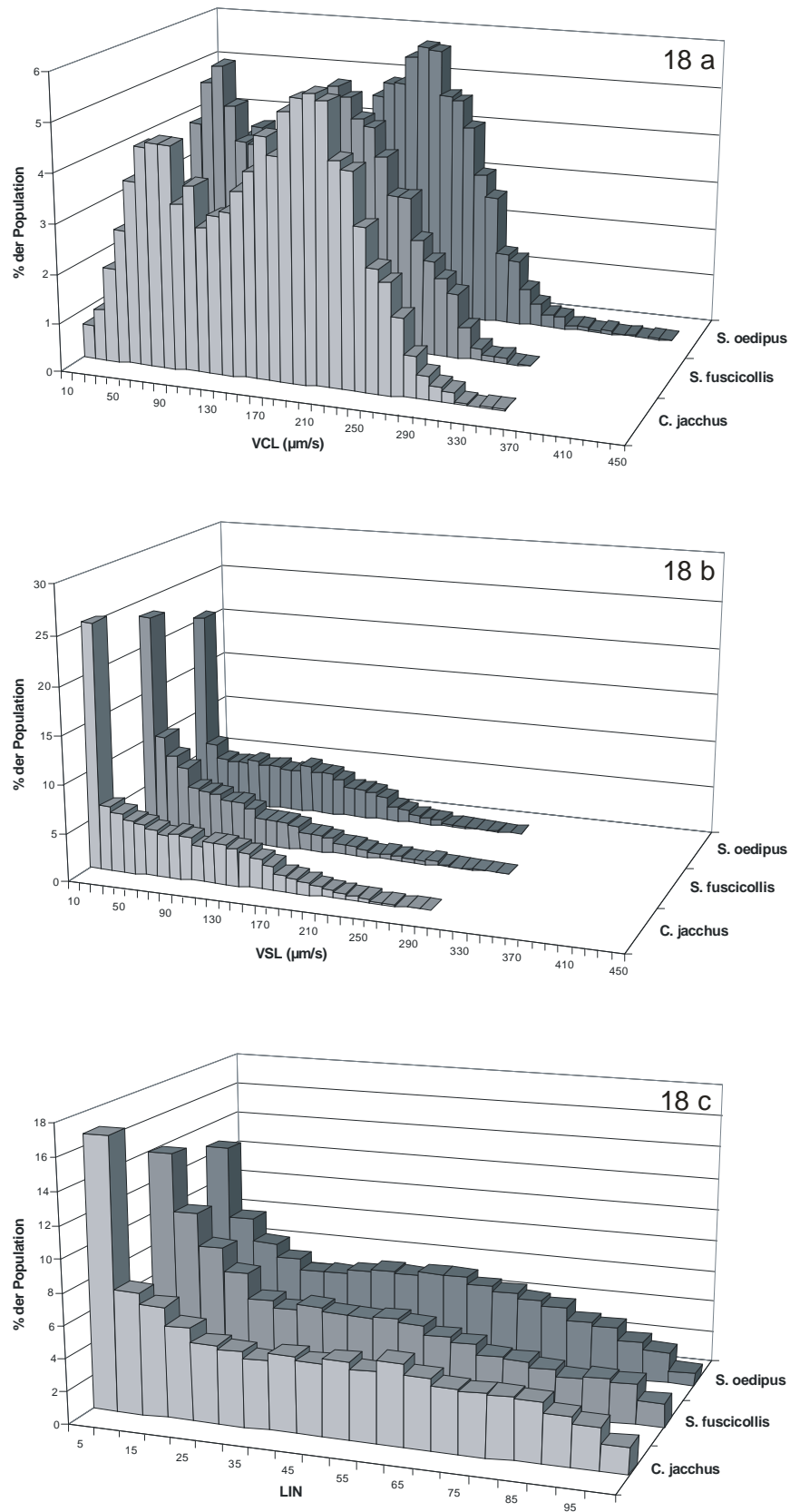


Abbildung 18 a-c: Populationshistogramme der kinematischen Parameter VCL, VSL und LIN.

d) Morphologie

Morphometrie

Die Spermatozoen aller drei Spezies haben die für Primaten typische Form mit einem ovalen dorsoventral abgeflachten Kopf (Abbildung 19 a-c; rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Frau Dr. K. Metz-Rensing, Deutsches Primatenzentrum, angefertigt).

Die Werte für Kopflänge, Kopfbreite und Verhältnis Kopflänge zu Kopfbreite (L/B) waren bei allen drei Spezies ähnlich und lagen für die Kopflänge zwischen 5,1 und 5,6 μm , für die Kopfbreite zwischen 3,2 und 3,3 μm und für L/B zwischen 1,5 und 1,7 (Abbildung 20). Bei allen drei Spezies waren die Spermatozoenköpfe uniform, die Streuung Kopfgröße war gering. Sehr große oder sehr kleine Spermatozoenköpfe waren selten.

Die Spermatozoen aller drei Spezies zeichneten sich durch lange Schwänze aus. Die Schwänze der Spermatozoen von *C. jacchus* waren mit 51,8 μm Länge kürzer als die der beiden Tamarinarten mit 55,2 μm bei *S. fuscicollis* und 59,4 μm bei *S. oedipus*.

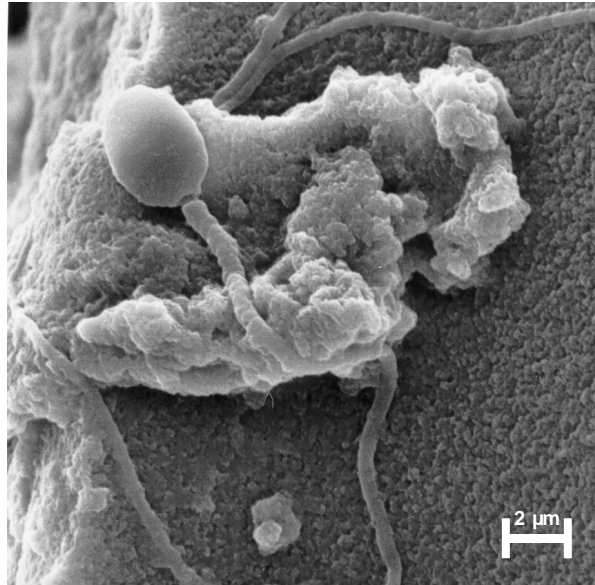
Pathomorphologie

In Abbildung 21 sind die Verteilungen der veränderten Spermatozoen dargestellt. Alle drei Spezies zeichneten sich durch uniforme Spermatozoenköpfe aus mit wenigen Kopfveränderungen. Der häufigste Kopfdefekt war ein fehlendes Akrosom. Andere Defekte waren selten, völlig mißgestaltete Köpfe kamen nicht vor.

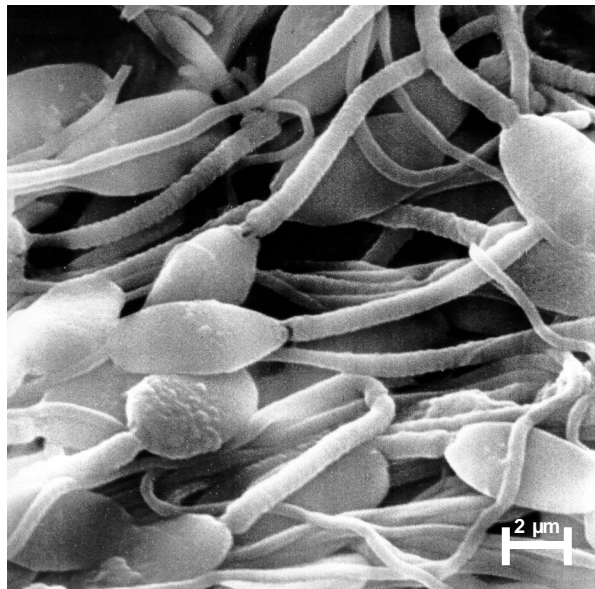
Die am häufigsten gefundene Defekte betrafen den Spermatozoenschwanz. Aufgerollte oder schleifenförmige Schwänze waren die am häufigsten zu beobachtenden Veränderungen.

Abbildung 19:
Rasterelektronenmikroskopische
Aufnahmen der Spermatozoen von
Krallenaffen

a) *C. jacchus*



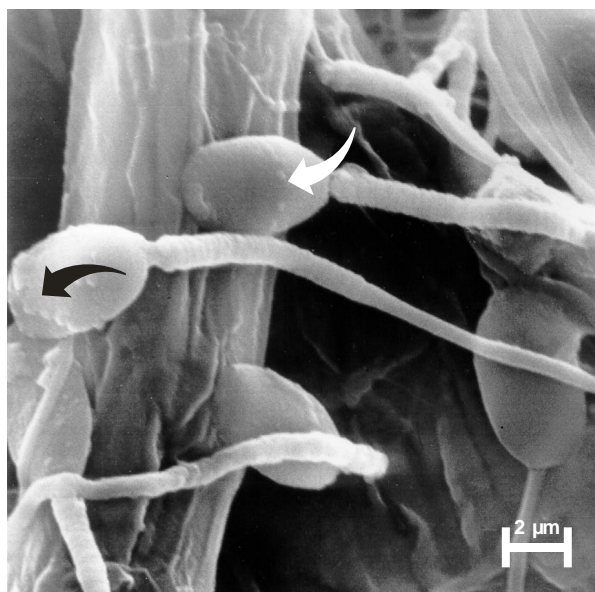
b) *S. fuscicollis*



weißer Pfeil:
Spermatozoon mit weitgehend
abgelöstem Akrosom

schwarzer Pfeil:
Spermatozoon mit partiell
abgelöstem Akrosom

c) *S. oedipus*



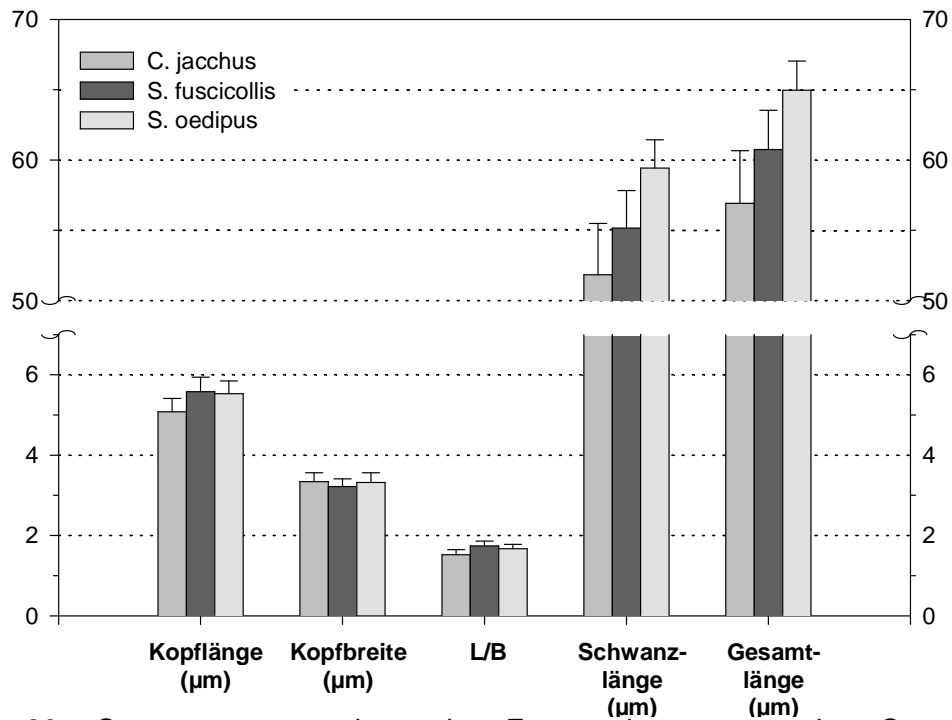


Abbildung 20: Spermatozoenmorphometrie. Es wurden von sechs *C. jacchus*, von fünf *S. fuscicollis* und von fünf *S. oedipus* jeweils 200 Spermatozoen vermessen.

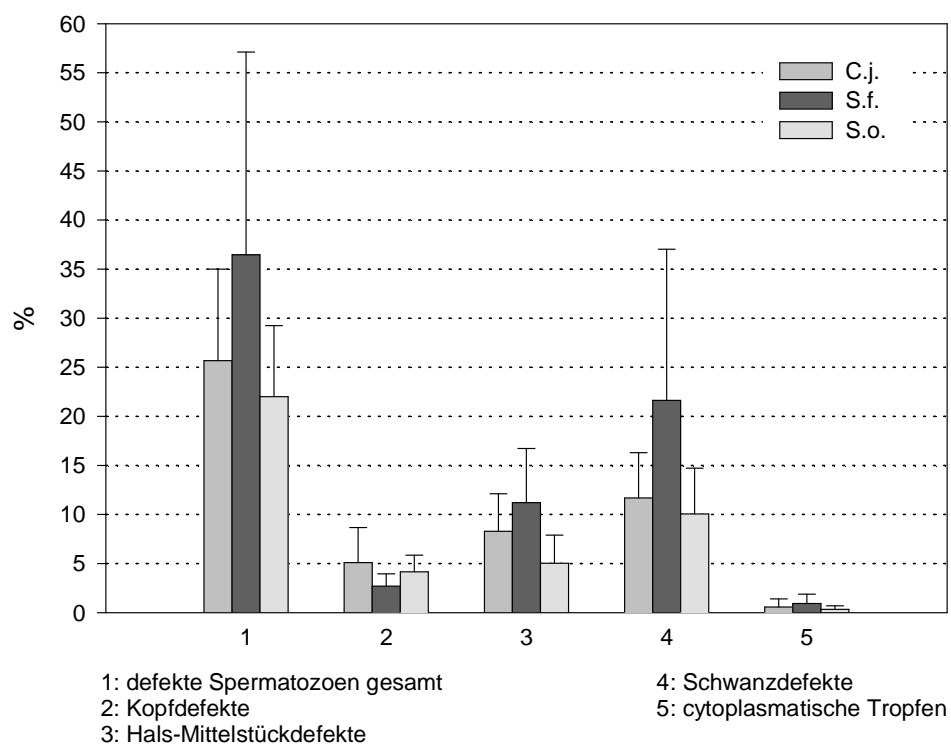


Abbildung 21: Pathomorphologie. Es wurden 24 Ejakulate von sechs *C. jacchus*, 25 Ejakulate von fünf *S. fuscicollis* und 25 Ejakulate von fünf *S. oedipus* analysiert

4.2 Penile Vibrostimulation (PVS)

Diese Versuche wurden nur an *C. jacchus* durchgeführt. Mit sechs *C. jacchus* wurden Versuche zur Samengewinnung mittels PVS durchgeführt. Von sechs weiteren Tieren wurden Ejakulate für andere Projekte gewonnen. Teilweise gehen die dabei gewonnenen Daten in diese Arbeit ein.

4.2.1 Reaktion der Tiere

PVS - Stimulationsschema:

1. Sequenz: 80 Hz, 1,0mm Amplitude
80 Hz, 1,5mm
90 Hz, 1,5mm
je 30 s 90 Hz, 2,0 mm
2 min Pause

2. Sequenz: 90 Hz, 1,5mm
90 Hz, 2,0mm
90 Hz, 2,5mm
je 30s 90 Hz, 3,0mm
2 min Pause

3. Sequenz:
entspricht der 2. Sequenz

37,7% der Ejakulationen wurden innerhalb der 1. Stimmulationssequenz herbeigeführt. In diesen Fällen wurden maximal 2 min benötigt, um ein Ejakulat zu gewinnen.

Während der 2. Stimmulationssequenz fanden 41% der Ejakulationen statt. Hier wurde inklusive 2 min Pause maximal 6 min benötigt, um eine Ejakulation auszulösen.

In 21,3% der Versuche konnte ein Ejakulat erst während der 3. Sequenz gewonnen werden. Die Stimmulationsdauer betrug dann 6 min, unterbrochen von zwei Pausen von jeweils 2 min. Insgesamt wurden die Tiere in diesen Fällen maximal 10 min der Prozedur unterzogen.

Der Zeitpunkt der Ejakulation war bei allen Tieren über den gesamten Stimmulationszeitraum verteilt. Bei einzelnen Tieren war jedoch eine Tendenz festzustellen gleich zu Beginn bzw. erst bei fortgeschrittener Stimulation zu ejakulieren.

In fast allen Fällen wurde eine Ejakulation ohne vorhergehende vollständige Erektion des Penis erzielt. Tatsächlich erfolgten die meisten Ejakulationen ohne jegliche Erektion. Der Grad der Erektion war somit kein Maßstab für eine adäquate

Stimulation. In vielen Fällen wurde eine vollständige Erektion erst nach der Ejakulation beobachtet.

Als ein sicheres Zeichen für eine bevorstehende Ejakulation und damit für eine adäquate Stimulation hat sich ein bestimmtes Verhalten des Tieres erwiesen; dabei wölbt das Tier in charakteristischer Weise den Rücken und schiebt das Becken nach vorne.

Absolute Voraussetzung für eine erfolgreiche PVS ist die Duldung des *handlings* durch das Tier. Damit ist weniger die Stimulation selbst, als das Halten in der Hand sowie das in-Position-bringen des Tieres auf der Tuchschnur gemeint. Bei Tieren, die das *handling* duldeten, war die Belastung durch die PVS gering. Auch bei hohen Stimulationsintensitäten schien das Unbehagen, wenn überhaupt, nur gering.

4.2.2 Erfolgsquote PVS

Von sechs *C. jacchus* wurden je sechs Ejakulate mittels PVS gewonnen und analysiert. Von diesen Tieren sowie von sieben weiteren *C. jacchus* wurden weitere Samenproben für andere Projekte der Abteilung Reproduktionsbiologie des Deutschen Primatenzentrums mit dieser Methode gesammelt. Die dabei gewonnenen Daten bezüglich der Erfolgsquote werden in dieser Arbeit berücksichtigt.

Von den 13 Tieren konnten in insgesamt 111 Versuchen 99 Ejakulate gewonnen werden (Tabelle 16). Die Erfolgsquote betrug damit 89,2%.

Das Tier Nummer 6253 duldet das *handling* nicht, ebenso Tier Nummer 6133.

Alle gewonnenen Ejakulate enthielten Spermatozoen. Bei allen Ejakulaten konnten freie Spermatozoen gewonnen werden, d.h. Ejakulate, bei denen alle Spermatozoen im Koagulum eingeschlossen blieben, kamen nicht vor.

Tabelle 16: Erfolgsquote der PVS bei *C. jacchus*

Tiernummer	Anzahl Versuche	Anzahl gewonnener Ejakulate
7039	16	15
6733	5	5
6521	18	16
6724	12	11
7046	15	15
6253	3	0
6133	3	1
5609	8	7
7135	12	12
6822	5	4
6234	8	7
7083	3	3
5912	3	3
Summe	111	99

4.2.3 Vergleich der Parameter von Ejakulaten gewonnen mittels RPE und PVS bei *C. jacchus*

Bei den Proben, die mittels RPE gewonnen wurden, enthielten einige keine oder nur einzelne Spermatozoen (siehe Tabelle 6), sodass keine weitere Analyse möglich war. Dagegen enthielten alle Ejakulate die mit PVS gewonnen wurden Spermatozoen. Auch waren Unterschiede in der Beschaffenheit der Ejakulatkoagula auffällig. In den RPE-Ejakulaten war das Koagulum in vielen Fällen stark ausgeprägt und widerstandsfähig gegen mechanisches Zerteilen (vorsichtiges auf- und abpipettieren). Bei einigen Ejakulaten war das Koagulum so fest, dass keine freien Spermatozoen gewonnen werden konnten. Dies gelang auch nicht durch Inkubation in Medium. Anders verhielt es sich bei den PVS-Ejakulaten. Hier konnten in allen Fällen freie Spermatozoen gewonnen werden. In den meisten Fällen war es auch möglich, das Koagulum durch vorsichtiges Pipettieren bis auf einige mikroskopisch erkennbare Flocken im Medium zu suspendieren.

Zum Vergleich der mittels RPE und PVS gewonnen Ejakulate wurden daher im Fall der Anwendung der RPE auf die vier Ejakulate der sechs Tiere (siehe Kapitel 4.1.3) zurückgegriffen, die sich von der Konsistenz her als vergleichbar darstellten.

4.2.3.1 Makroskopische Ejakulatuntersuchung

Ejakulatvolumen

Das Gewicht bzw. das Volumen der Ejakulate unterschied sich nicht signifikant (ANOVA) zwischen den beiden Stimulationsmethoden. Zwar war das durchschnittliche Volumen bzw. Gewicht bei den mittels RPE gewonnenen Ejakulaten höher, die Variabilität war allerdings sehr groß (Abbildung 22a).

4.2.3.2 Mikroskopische Ejakulatuntersuchung

a) Spermatozoenkonzentration und Anzahl Spermatozoen pro Ejakulat

Die Konzentration der Spermatozoen in den mittels PVS gewonnenen Ejakulaten ebenso wie die Anzahl der Spermatozoen pro Ejakulat war beträchtlich höher als bei jenen mit RPE gewonnenen Ejakulaten. Dieser Unterschied war für beide Parameter signifikant (siehe Abbildung 22b + c).

b) Anteil lebender und motiler Spermatozoen

Auch der Anteil lebender und motiler Spermatozoen war bei den mittels PVS gewonnenen Ejakulaten signifikant größer (siehe Abbildung 22d):

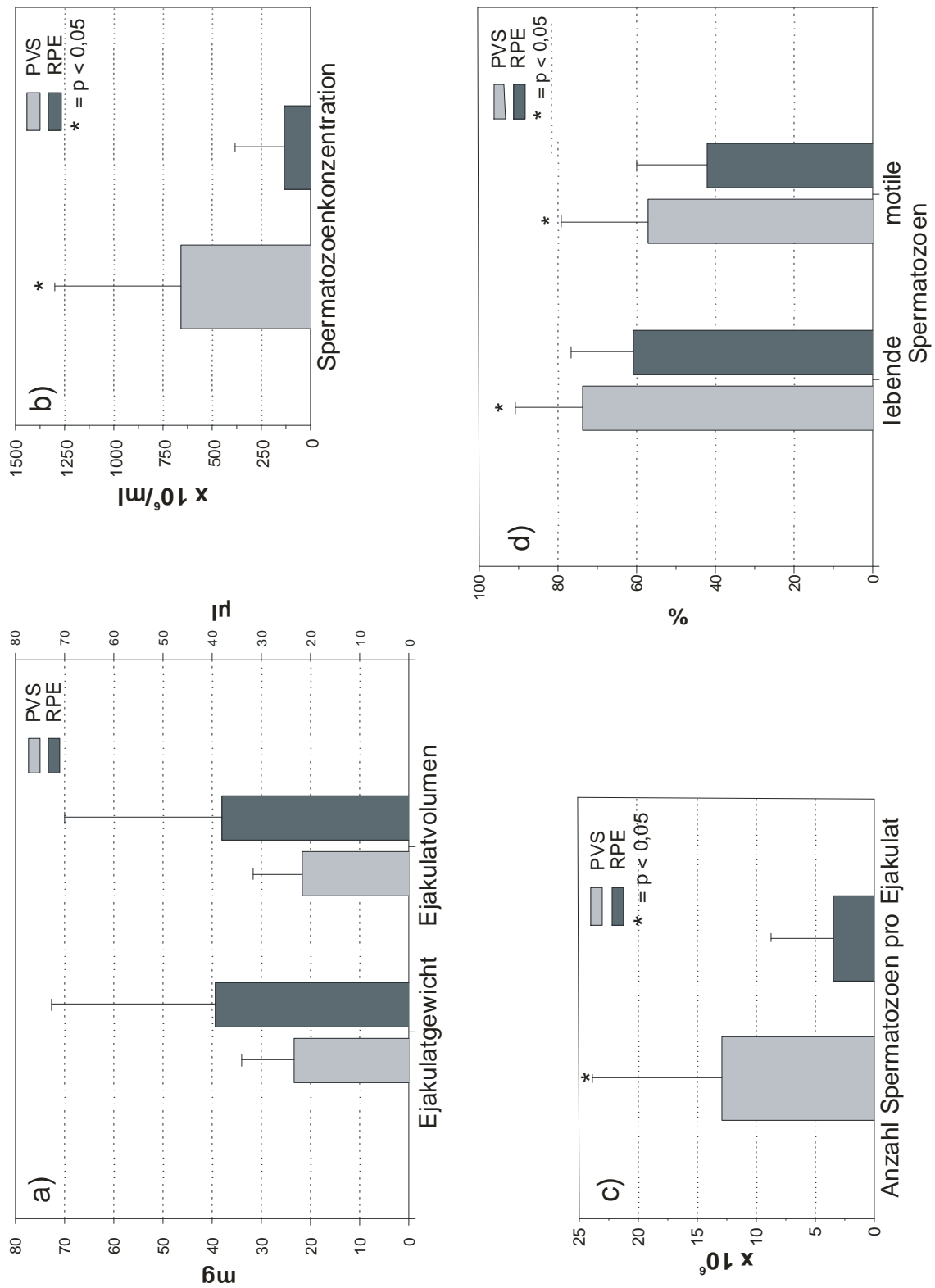


Abbildung 22: Vergleich der Parameter von Ejakulaten gewonnen mittels RPE und PVS

c) Kinematische Parameter

Die Spermatozoen in den mittels PVS gewonnenen Ejakulaten schwammen im Durchschnitt schneller und beschrieben eine geradere Bewegungsbahn als die Spermatozoen aus den RPE-Ejakulaten. Tabelle 17 zeigt die Zusammenstellung der mittels CASA ermittelten kinematischen Parameter.

Tabelle 17: Kinematische Parameter (siehe Abbildung 11, Seite 43)

	RPE	PVS	ANOVA
VCL (µm/s)	147,0 ± 20,8	167,7 ± 28,2	F(1,10) = 19,41, p < 0,001 *
VAP (µm/s)	108,1 ± 20,1	134,5 ± 31,3	F(1,10) = 14,38, p < 0,004 *
VSL (µm/s)	66,6 ± 19,5	96,5 ± 28,7	F(1,10) = 15,43, p < 0,003 *
LIN (%)	38,6 ± 10,2	52,3 ± 11,4	F(1,10) = 23,10, p < 0,001 *
STR (%)	54,3 ± 11,1	65,9 ± 8,4	F(1,10) = 21,71, p < 0,001 *
MAD (°)	34,6 ± 6,9	32,9 ± 7,2	F(1,10) = 1,95, p < 0,193
BCF (Hz)	9,2 ± 3,6	9,6 ± 3,8	F(1,10) = 0,11, p < 0,751
ALH (µm)	7,0 ± 2,2	7,6 ± 2,2	F(1,10) = 0,28, p < 0,611

Mittelwerte ± Standardabweichung

PVS: sechs Tiere, sechs Ejakulate pro Tier und 300 Spermatozoenbewegungsbahnen pro Ejakulat wurden analysiert

RPE: sechs Tiere, vier Ejakulate pro Tier und 300 Spermatozoenbewegungsbahnen wurden analysiert

Die Parameter der Spermatozoengeschwindigkeit (VCL, VAP, VSL) sowie die Parameter, die die Krümmung der Bewegungsbahn beschreiben (LIN, STR) waren signifikant verschieden.

Diese Unterschiede sind auch in den Histogrammen zu erkennen, die die Verteilung der Spermatozoen bezüglich VCL, VSL und LIN innerhalb der Gesamtpopulation darstellen (Abbildung 23 a-c). Abbildung 23 a zeigt die Verteilung der Spermatozoen bezüglich der VCL. Bei beiden Gewinnungsmethoden sind zwei Gipfel von schnell und langsam schwimmenden Spermatozoen zu erkennen. Die absolute Geschwindigkeit war bei beiden Gewinnungsmethoden gleich. Die mittels PVS

gewonnenen Ejakulate enthielten mehr schnell schwimmende und weniger langsame Spermatozoen als die mittels RPE gewonnenen Proben.

Abbildung 23 b zeigt die Verteilung bzgl. VSL. Auch hier sind keine Unterschiede in der absoluten Geschwindigkeit vorhanden. Allerdings waren auch hier in PVS gewonnenen Ejakulaten mehr Spermatozoen mit einer höheren Geschwindigkeit vorhanden.

Deutlicher sind die Unterschiede in der Linearität (LIN) der Bewegungsbahn (Abbildung 23 c). Im Histogramm ist zu erkennen, dass die mittels PVS gewonnenen Ejakulate mehr Spermatozoen enthalten, die auf einer geraden Bahn schwammen.

Die Werte der Parameter, die die Bewegung bzw. die Auslenkung des Spermatozoenkopfes während der Vorwärtsbewegung beschreiben (MAD, BCF, ALH), waren bei beiden Gewinnungsmethoden ähnlich (Tabelle 17).

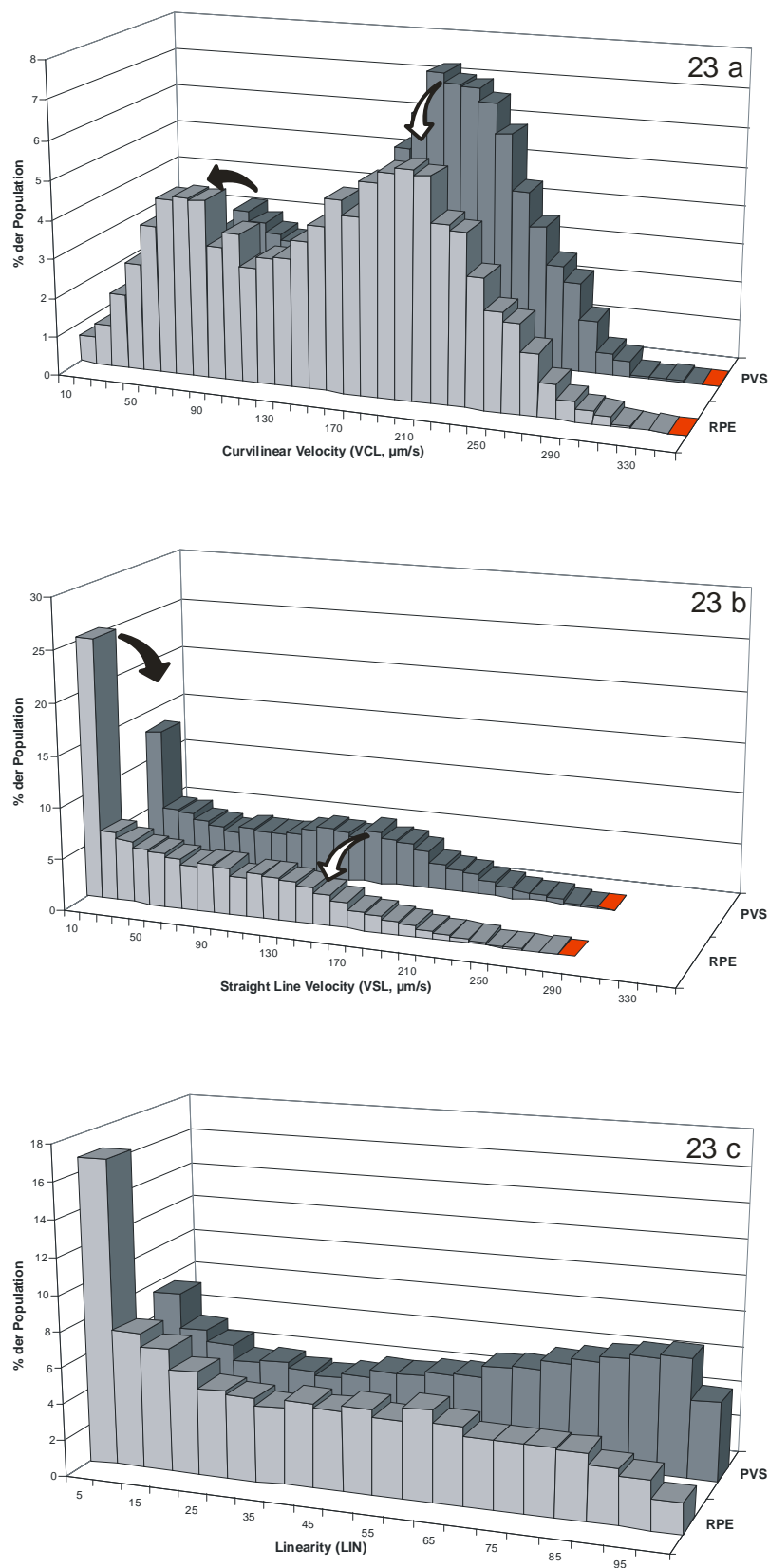


Abbildung 23 a-c: Populationshistogramme der kinematischen Parameter VCL, VSL und LIN im Vergleich RPE und PVS

d) Morphologie

Pathomorphologie

Bei den beiden Gewinnungsmethoden traten keine signifikanten Unterschiede bzgl. der Häufigkeit des Auftretens von defekten Spermatozoen auf (Abbildung 24). Dies trifft zu für defekte Spermatozoen insgesamt sowie für Kopf-, Hals-/Mittelstück- und Schwanzdefekte. Lediglich traten bei den mittels PVS gewonnenen Proben signifikant mehr Spermatozoen mit cytoplasmatischen Tropfen auf.

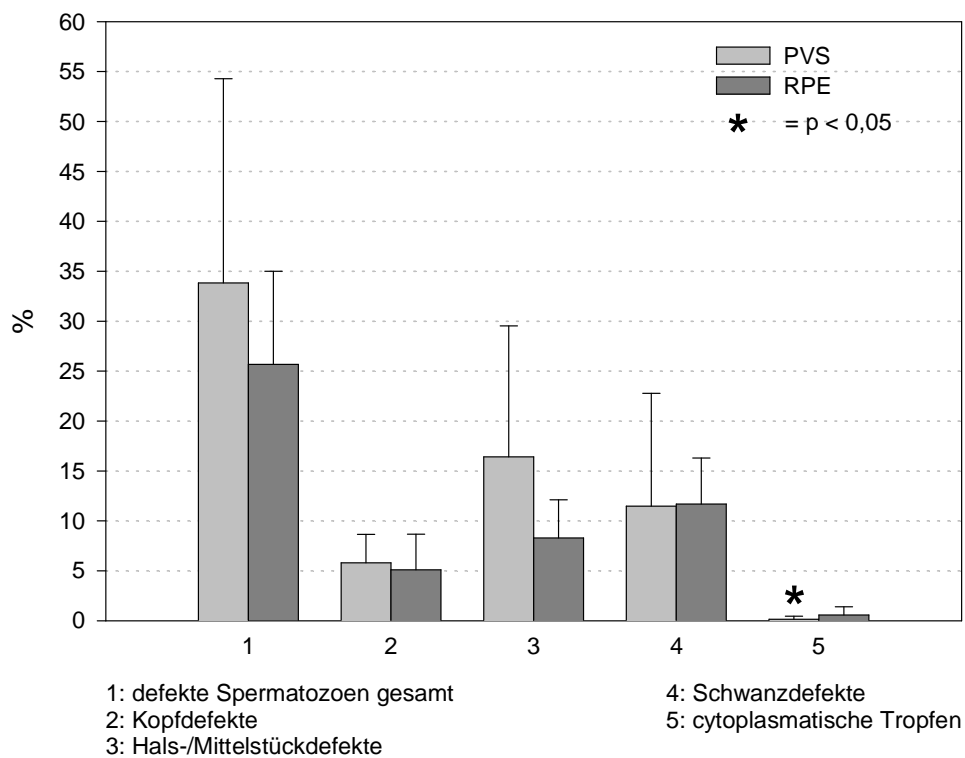


Abbildung 24: Vergleich des Auftretens von defekten Spermatozoen in Ejakulaten, die mittels RPE und PVS gewonnen wurden.

5. Diskussion

5.1 Elektroejakulation (RPE)

Die Ejakulation ist ein komplizierter Prozess von mehreren hintereinander geschalteten, ineinandergreifenden und synchronisierten Reflexen. Bei der RPE werden alle Nervenfasern im Bereich des Beckens gleichzeitig und ohne Synchronisation der erforderlichen Reflexe stimuliert. Es ist daher mittels RPE nicht möglich, die Organisation der natürlichen Reflexkette nachzuahmen (Martin, 1978; Schaffer et al., 1989a). Ziel der RPE muss nach Martin (1978) sein, durch suffiziente elektrische Stimulation Samenflüssigkeit in die Urethra zu bewegen. Durch den Druckanstieg im hinteren Teil der Urethra soll das Tier dann in der Lage sein, den Inhalt per Reflex zu entleeren. Die Erkenntnisse, wie eine suffiziente elektrische Stimulation zu erzielen ist, wurden weitgehend empirisch ermittelt. Dabei handelt es sich um Erfahrungen bezüglich verschiedener Narkosemöglichkeiten, Rektalsondengeometrie, Stimulationsmuster und Regime des elektrischen Stroms. Zum Teil unterscheiden sich die Angaben bei verschiedenen Autoren deutlich, und trotz Bemühungen reproduzierbare Protokolle zu entwickeln, ist die zuverlässige Gewinnung von Ejakulaten im hohen Maß abhängig von den Fähigkeiten des Durchführenden (Schaffer et al., 1989b). Diese Umstände spiegeln die Schwierigkeiten wieder, den komplizierten Prozeß der Ejakulation durch mehr oder weniger ungezielte elektrische Stimulation auszulösen.

Diese Schwierigkeiten sind um so größer, je kleiner die Tiere sind, von denen man ein Ejakulat gewinnen möchte, und dementsprechend seltener sind Beschreibungen der RPE bei kleinen Spezies zu finden.

Für die in dieser Arbeit als Studienobjekte fungierenden sehr kleinen Krallenaffen sind praktisch nur zwei detaillierte Studien (Cui et al., 1991; Morrell et al., 1996) verfügbar. Beide Studien wurden bei *C. jacchus* durchgeführt. Die Methoden der RPE waren dabei sehr unterschiedlich.

Cui et al. (1991) erzielten mit ihrer Methode der RPE eine ungewöhnlich hohe Erfolgsquote von rund 96 %. Sie haben entgegen der in der Literatur allgemein empfohlenen Methodik nicht Ketamin sondern Saffan™ als Injektionsnarkotikum sowie eine Rektalsonde mit Ringelektroden verwendet. Stimuliert wurde in

rhythmischen Intervallen beginnend mit 4 V bis zu 8 V. Es werden keine Angaben über die Frequenz des elektrischen Stroms und das genaue Stimulationsmuster gemacht.

In der jüngeren Studie, die Morrell et al. (1996) im Deutschen Primatenzentrum durchgeführt haben, wurde ein wesentlich schlechteres Ergebnis erzielt. Die in dieser Studie angewendete Methode der RPE entsprach mehr den in der Literatur zur RPE von Primaten empfohlenen Methoden mit Ketamin als Injektionsnarkotikum und einer Rektalsonde mit Längselektroden. Es wurde elektrischer Strom von 50 Hz verwendet. Stimuliert wurde ebenfalls in rhythmischen Intervallen und mit steigender Spannung (4-8V).

Da Cui et al. (1991) eine sehr hohe Erfolgsquote erzielten, bot die von ihnen beschriebene Methode die beste Aussicht auf eine erfolgreiche Elektroejakulation. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die ersten Versuche nach dieser Methode durchgeführt, soweit dies aus den von Cui et al. (1991) gemachten Angaben nachvollziehbar war. Mit Ausnahme von *S. fuscicollis* konnte mit diesem Verfahren keine befriedigende Erfolgsquote erzielt werden (*S. fuscicollis*: 73%, *C. jacchus*: 37%, *S. oedipus*: 35%). Darüber hinaus war die Methode sehr unzuverlässig, von vielen Tieren konnte überhaupt kein Ejakulat gewonnen werden.

Aus diesem Grund wurden weitere Versuche durchgeführt, die sich an den in der Literatur zur RPE von Primaten empfohlenen Methoden orientierten, d.h. es wurden Rektalsonden mit Längselektroden sowie Ketamin zur Durchführung der Narkose verwendet. Diese Versuche wurden mit *C. jacchus* durchgeführt, da von dieser Spezies mehr Tiere zur Verfügung standen. Nur die erfolgreichste Methode sollte dann bei den beiden anderen Spezies zur Anwendung kommen. Diese Versuche führten nicht zu einer Verbesserung der Erfolgsquote.

Erst mit der in Versuchsprotokoll 5 beschriebenen Prozedur konnte eine zuverlässige Methode zur RPE von Krallenaffen etabliert werden. Es wurde eine hohe Erfolgsquote bei *C. jacchus* und *S. oedipus* erzielt (94% bzw. 96%). Damit konnte zum ersten Mal eine erfolgreiche Methode der RPE bei Vertretern aus der Gattung *Saguinus* beschrieben werden. Aus Gründen des Kolonienmanagement standen die Braunrückentamarine nur für die ersten Versuche zur Verfügung. Daher konnte die Methode aus Versuchsprotokoll 5 bei dieser Spezies nicht getestet werden. Nach

den in dieser Arbeit gemachten Erfahrungen ist aber zu vermuten, dass diese Methode auch bei *S. fuscicollis* gut funktioniert.

Die Vorgehensweise nach Versuchsprotokoll 5 unterschied sich deutlich von den in der Literatur allgemein empfohlenen Methoden. Statt Ketamin hat sich die Verwendung von Saffan™ zur Durchführung der Narkose als geeigneter erwiesen. Auch wurden keine Rektalsonden mit Längselektroden verwendet, sondern eine davon völlig abweichende Sonde, mit einer Kupferspitze und einem Schaft, der in voller Länge aus Kupfer bestand. Die elektrische Stimulation wurde mit an/aus-Impulsen statt durch rhythmische Stimulation mit an- und abschwellender elektrischer Spannung durchgeführt.

In der Durchführung der elektrischen Stimulation mit an/aus-Impulsen unterschied sich diese Methode auch von der von Cui et al. (1991) beschriebenen Vorgehensweise. Cui et al. (1991) verwendeten in ihrer Arbeit eine Rektalsonde mit zwei Ringelektroden. Warum die von Cui et al. (1991) beschriebene Methode in dieser Arbeit nicht zum Erfolg führte, konnte im Rahmen dieser Untersuchung nicht geklärt werden.

Von allen getesteten RPE-Methoden war die Vorgehensweise von Versuchsprotokoll 5 für das Tier am schonendsten. Zwar wurde die Stimulation mit einer höheren elektrischen Spannung begonnen und durch die an/aus-Impulse waren die Muskelkontraktionen heftiger als bei langsam an- und abschwellender Stimulation. Insgesamt wurden aber deutlich weniger Einzelstimulationen als bei allen anderen getesteten Protokollen benötigt. Die Zeit, in der elektrischer Strom floß, war ebenfalls wesentlich geringer und die RPE war insgesamt schneller abgeschlossen.

Im Vergleich zu den anderen Versuchsprotokollen war darüber hinaus die RPE nach Versuchsprotokoll 5 wesentlich einfacher durchzuführen. Dies ist ein Umstand, der insbesondere bei kleinen Spezies wie den Krallenaffen besonders wichtig ist, da hier die Handhabung der Rektalsonden schwierig ist. Durch die besondere Geometrie von Rektalsonde c (bestehend aus Kupferspitze und Kupferschaft) ist nach dem Einführen ins Rektum das Beibehalten der Position in horizontaler Richtung als auch die Rotation der Sonde nicht so wichtig wie bei den Sonden mit Längselektroden.

Rektalsonden mit Längselektroden bieten durch die Anordnung der Elektroden auf einer Seite der Sonde die Möglichkeit, den elektrischen Reiz auf den Bereich des Beckenbodens zu fokussieren. Das hat Vorteile, da weniger Strukturen dem elektrischen Strom ausgesetzt sind und dadurch unerwünschte Reaktionen des Tieres (im Wesentlichen Kontraktion der Skelettmuskulatur der Beckengliedmaßen) reduziert werden. Der Nachteil ist folglich aber auch, dass schon durch geringe Rotation der Sonde die Bereiche der Beckenhöhle, die für die Auslösung der Ejakulation wichtig sind, aus dem Fokus der elektrischen Reizung geraten. Dies gilt auch für das horizontale Verschieben der Sonde. Je kleiner das Tier und die verwendete Rektalsonde ist, um so gravierender wirken sich schon geringfügige Positionsänderungen aus. Bei großen Spezies wie zum Beispiel Makaken spielt geringfügiges Verrutschen der Sonde kaum eine Rolle. Hier hat die Reduktion der Muskelkontraktionen durch Verwendung von Sonden mit Längselektroden eine größere Bedeutung, da diese auf Grund der größeren Muskelmasse auch entsprechend heftiger ausfallen.

Bei den in dieser Studie untersuchten sehr kleinen Primatenspezies hat sich die Verwendung von Längselektroden als sehr unpraktisch erwiesen, da eine reproduzierbare und gezielte elektrische Stimulation praktisch nicht möglich war. Ähnliches, wenn auch in geringerem Ausmaß, gilt für die Verwendung von Sonden mit Ringelektroden. Ungewollte Rotation der Sonde spielt hier zwar keine Rolle, die Position der Sonde im Rektum ist aber dennoch wichtig.

Eine wichtige Option für eine erfolgreiche Durchführung der RPE ist die Wahl des Narkosemittels. Ketamin ist durch seine dissoziative Narkose als das Injektionsnarkotikum der Wahl zur RPE von Primaten in der Literatur beschrieben. Bei den kleinen Krallenaffen hat sich in der vorliegenden Studie die Verwendung von Saffan™ als geeigneter herausgestellt. Mit der verwendeten Dosierung von Ketamin krampften die Tiere stark. Auch schien die Narkosetiefe nicht ausreichend, um eine tierschutzgerechte Durchführung der RPE zu gewährleisten. Schon nach 10 – 15 Minuten wurde wieder ein Narkosestadium erreicht, in dem die RPE nicht mehr durchführbar war. Trotzdem war die nachfolgende Erholungsphase im Vergleich zur Anwendung von Saffan™ sehr lang. Damit verbunden ist auch ein deutlich späteres Zurücksetzen der Tiere zu ihrem Familienverband oder Partner und eine verlängerte Nahrungskarenz. Das ist insbesondere bei kleinen Tieren von Nachteil. Bezüglich

der zur RPE geeigneten Narkosetiefe finden sich in der Literatur widersprüchliche Angaben. Einige Autoren empfehlen eine möglichst flache Narkose (Bennett, 1967; Martin, 1978), andere sprechen von einem chirurgischen Stadium (Wildt et al., 1996). In der vorliegenden Studie hat sich eindeutig gezeigt, dass eine Narkosetiefe als geeignet angesehen werden muss, die auch für chirurgische Eingriffe genügend tief ist. Zum einen aus Tierschutzgründen, zum anderen aber auch weil die Prozedur bei einem entspannt schlafenden Tier gezielter durchführbar ist. Da bei der RPE übergeordnete neuronale Zentren nicht angesprochen werden, sondern nur der efferente Schenkel eines Reflexbogens genutzt wird, ist eine zu flache Narkose eher abträglich.

Saffan™ war aus den oben genannten Gründen Ketamin deutlich überlegen. Es zeichnete sich durch einen raschen Narkoseeintritt, ausreichend tiefe und lange Narkose ohne Krampfneigung und sehr schnelle, vollständige Erholung der Tiere aus.

Von entscheidender Bedeutung für die RPE bei Krallenaffen war die elektrische Stimulation mit kurzen an/aus-Impulsen bei gleichbleibender elektrischer Spannung. Wie oben beschrieben müssen Spermatozoen und Sekrete der akzessorischen Geschlechtsdrüsen in die Urethra bewegt werden, damit diese sich dann reflexartig entleeren kann. Durch kurze elektrische an/aus-Impulse wird dieser Prozess besser angeregt. Durch die kurzen Stromstöße wird der Prozess der Ejakulation zuverlässiger ausgelöst, während bei dem durch langsam an- und absteigende elektrische Spannung gekennzeichneten Stimulationsprotokoll a mit vergleichsweise lang andauerndem elektrischen Stromfluss, die erregbaren Strukturen im Beckenbereich nach wenigen Stimulationszyklen in einen refraktären Zustand gebracht werden. Tatsächlich nahm die Wahrscheinlichkeit der Gewinnung eines Ejakulates mit zunehmender Dauer der elektrischen Stimulation bei Anwendung von Stimulationsprotokoll a ab.

5.2 Parameter von mittels RPE gewonnenen Ejakulaten der drei Krallenaffenspezies *C. jacchus*, *S. fuscicollis* und *S. oedipus*

Ejakulate von drei Vertretern aus der Familie der Callitrichidae wurden analysiert, um Basisdaten über Ejakulatcharakteristika zu erhalten. Bisher lagen Ejakulatuntersuchungen nur von *C. jacchus* vor (Cui et al., 1991; Morrell et al., 1996). Analysen der kinematischen Bewegungsparameter wurden bisher ebenfalls nur bei *C. jacchus* durchgeführt (Morrell et al., 1996). In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal Ejakulatuntersuchungen bei Krallenaffen der Gattung *Saguinus* durchgeführt.

Alle drei untersuchten Spezies zeichneten sich durch ein sehr kleines Ejakulat aus (18,1 – 39,9 µl). Die in dieser Arbeit erzielten Werte entsprachen den von Cui et al. (1991) bei *C. jacchus* ermittelten Werten. Morrell et al. (1996) geben diese Information nicht, da das Ejakulat ohne Volumenbestimmung unmittelbar nach der Gewinnung mit Medium versetzt wurde.

Das extrem geringe Volumen schränkt die Nutzbarkeit der Ejakulate stark ein. Für eine ausführliche Qualitätsanalyse wird ein nicht unerheblicher Teil der Ejakulate verbraucht. Das kann für eine anschließende Nutzung (z.B. zur künstlichen Besamung, Gefrierkonservierung o.ä.) problematisch sein. Dieses Problem muss vor jeder geplanten Anwendung bedacht werden und eine erforderliche Qualitätsanalyse auf das jeweils Notwendige beschränkt werden.

Im Vergleich zu anderen Primatenspezies (Wildt, 1986; *Saimiri sciureus*, Bennett, 1967; *Saimiri boliviensis*, Yeoman et al., 1998; *Cercopithecus aethiops*, Seier et al., 1989; *Papio spp.*, Kraemer & Vera Cruz, 1969; *Papio ursinus*, Bornmann et al., 1988; *Macaca mulatta*, Harrison, 1980; Gould & Mann, 1988; Lanzendorf et al., 1990; *Pan troglodytes*, Young et al., 1995; *Gorilla spp.*, Platz et al., 1980; Schaffer et al., 1991) liegen die hier untersuchten Krallenaffen bezüglich der Spermatozoenkonzentration im oberen Mittelfeld. Durch das geringe Volumen der Ejakulate ist die Anzahl der Spermatozoen pro Ejakulat bei Krallenaffen allerdings gering.

Zu Bedenken ist allerdings, dass ein variabler und nicht bekannter Anteil an Spermatozoen im Koagulum eingeschlossen bleibt. Bei der Bestimmung der Spermatozoenkonzentration wurden nur die freien Spermatozoen erfasst. Die hier ermittelten Werte repräsentieren daher nicht die Gesamtzahl der in einem Ejakulat

enthaltenen Spermatozoen, sondern nur die freien und auch tatsächlich nutzbaren Spermatozoen.

Bei allen drei Spezies war eine erhebliche inter- und intraindividuelle Variabilität der Ejakulatparameter Volumen, Spermatozoenkonzentration und Gesamtzahl Spermatozoen pro Ejakulat festzustellen. Obwohl auch bei natürlich gewonnenen Ejakulaten hohe Variabilitäten beschrieben wurden (VandeVoort et al., 1993; Young et al., 1995; Yeoman et al., 1998), liegen die Gründe dafür vermutlich zu einem großen Teil in der Auslösung der Ejakulation durch die RPE. Von Versuch zu Versuch können die akzessorischen Geschlechtsdrüsen unterschiedlich stark stimuliert sowie der Transport der Spermatozoen aus dem Nebenhoden unterschiedlich stark angeregt werden. Bei anderen Spezies ist bei Anwendung der RPE der Verlust eines Teils des Ejakulates in die Blase durch retrograde Ejakulation nachgewiesen (Schaffer et al., 1989a; Dooley et al., 1991; Schaffer et al., 1991). Ebenso trägt die Formation des Koagulums und das damit verbundene Einschließen von Spermatozoen zur hohen Variabilität der Parameter Konzentration und Gesamtanzahl bei.

Im Durchschnitt war bei allen drei Spezies ein hoher Anteil lebender und motiler Spermatozoen vorhanden. Allerdings traten bei allen drei Spezies immer wieder einzelne Ejakulate mit einem sehr geringen Anteil lebender und auch motiler Spermatozoen auf. Bei einigen Ejakulaten konnte Urinkontamination als Ursache ausgemacht werden. Darüber hinaus unterliegen sehr kleine Ejakulate während der Behandlung leicht Temperaturschwankungen. Sehr wahrscheinlich hatten Temperaturschwankungen trotz aller Maßnahmen zur Konstanterhaltung der Temperatur einen Einfluß auf den Anteil lebender und motiler Spermatozoen.

Hinsichtlich ihrer kinematischen Parameter zeichnen sich Krallenaffenspermatozoen durch eine sehr schnelle Vorwärtsbeweglichkeit aus. Ähnliche Werte wurden für die Spermatozoen von Javaneraffen beschrieben (Yeung et al. 1989). CASA bietet die Möglichkeit, durch Bestimmung verschiedener Bewegungsparameter die Spermatozoenbeweglichkeit objektiv und reproduzierbar zu charakterisieren. Darüber hinaus besteht mittels CASA die Möglichkeit, Subpopulationen von Spermatozoen mit abweichenden Bewegungscharakteristika aufzuspüren und zu

untersuchen (Yeung et al., 1989; Mortimer, 1997). Zurzeit ist noch unklar, ob Subpopulationen von Spermatozoen mit bestimmten Bewegungsmustern schon präejakulatorische Unterschiede repräsentieren und welche physiologische Bedeutung diese haben. Nachgewiesen ist, dass Spermatozoen in einem bestimmten Stadium der Kapazitierung ihr Bewegungsmuster deutlich ändern, ein Phänomen, das als Hyperaktivierung bezeichnet wird (Yanagimachi, 1970; Yeung et al., 1989; Burkman, 1995; Mortimer, 1997). Bei allen drei Krallenaffenspezies wurden in dieser Studie im Bewegungsparameter VCL (*curvilinear velocity*, Spurgeschwindigkeit) zwei Populationen von schnell und langsam schwimmenden Spermatozoen gefunden. Yeung et al. (1989) haben bei der Untersuchung von Ejakulaten von Javaneraffen ebenfalls eine bimodale Verteilung in diesem Parameter gefunden. Bei den langsam schwimmenden Spermatozoen von Schimpansen war die Verteilung nur eingipfelig (Gould et al., 1993). Inwieweit dieses Ergebnis die Spermatozoenphysiologie dieser Spezies reflektiert oder aber mögliche Artefakte darstellt, bedingt z.B. durch die Gewinnungsmethode oder die verwendeten *in vitro*-Bedingungen, ist schwierig zu beurteilen.

Möglich ist auch, dass das Auftreten von zwei Populationen Ausdruck der Schädigung eines Teils der Spermatozoen ist. Werden Spermatozoen geschädigt, z.B. durch Temperaturschwankungen oder durch ein ungünstiges Milieu, hat das einen negativen Einfluß auf die Beweglichkeit. Solche Spermatozoen werden immotil oder schwimmen langsamer. Da sich Krallenaffenspermatozoen sehr schnell fortbewegen, werden langsame Spermatozoen deutlicher von den schnellen abgegrenzt. Bei langsamen Spermatozoen, wie zum Beispiel die des Schimpansen, ist dieser Übergang dagegen fließend.

Die Spermatozoen der drei Krallenaffenspezies haben die für Primaten typische Form mit einem ovalen dorsoventral abgeflachten Kopf (Bedford, 1974). Die Vermessung der Spermatozoenköpfe sowie die morphologische Beurteilung der Spermatozoen haben ergeben, dass alle drei Spezies sich durch sehr uniforme Spermatozoenköpfe mit wenigen und geringfügigen Abweichungen auszeichnen. Zwar wurde in einzelnen Ejakulaten ein vergleichsweise hoher Prozentsatz an Kopfdefekten gefunden. Allerdings handelte es sich dabei zum überwiegenden Teil um geschädigte oder abgelöste Akrosomen. Solche abgelösten oder in Ablösung befindlichen Akrosomen sind auf den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen

zu erkennen. In Abbildung 19c (Seite 69) ist ein Spermatozoon mit weitgehend abgelöstem Akrosom zu erkennen, bei dem nur noch das äquatoriale Segment des Akrosoms schwach auszumachen ist (weißer Pfeil). Bei dem mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichneten Spermatozoon ist eine partielle Ablösung an der Akrosomspitze zu erkennen.

Andere Kopfmißbildungen wie kleine, große und amorphe Köpfe wurden zwar gefunden, allerdings nur in sehr geringer Zahl. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch von Cui et al. (1991) für *C. jacchus* beschrieben.

Mit Ausnahme von Menschen und Gorilla (Seuanez et al., 1977) findet man bei allen diesbezüglich bisher beschriebenen Primatenspezies einen hohen Anteil an morphologisch intakten Spermatozoen (Seier et al., 1996; Gago et al., 1999; Bedford, 1974). Insofern stellen die Krallenaffen keine Ausnahme unter den Primaten dar. Auch nicht darin, dass im Falle eines hohen Prozentsatzes an Anomalien, diese fast ausschließlich den Spermatozoenschwanz betreffen. Die am häufigsten gefundenen Schwanzdefekte bei allen drei Krallenaffenspezies waren haarnadelförmige und aufgerollte Schwänze. Welche Anomalien der Spermatozoen von Krallenaffen als primäre, sekundäre oder tertiäre Effekte anzusehen sind ist unbekannt (Cui et al., 1991). Insbesondere Schwanzanomalien können jedoch durch die Behandlung nach der Ejakulation hervorgerufen werden, etwa bei der Trocknung der Ausstriche, durch zu niedrige Temperaturen und besonderes durch hypoosmotischen Streß (Seier et al., 1996). Die Ursache des häufigen Auftretens von Schwanzdefekten in dieser Studie kann nicht abschließend ergründet werden. Wahrscheinlich ist aber, insbesondere in Hinblick auf die hohe Uniformität der Spermatozooköpfe, dass der Großteil der Schäden nach der Ejakulation entstanden ist. Hier könnten die Ursachen in der schwierigen Handhabung der sehr kleinen Ejakulate liegen, die leicht Temperaturschwankungen ausgesetzt sind, sowie den besonderen Umständen der Koagulumformation und Zusammensetzung des Seminalplasmas bei der RPE und damit verbundenen ungünstigen Milieubedingungen. Nicht zuletzt ist aber auch denkbar, dass das verwendete Medium noch der Verbesserung und Optimierung bedarf.

5.3 Penile Vibrostimulation (PVS) und Vergleich der Parameter der mittels RPE und PVS gewonnenen Ejakulate bei *C. jacchus*

Die vorliegende Studie stellt ein verbessertes Protokoll zur Durchführung der PVS beim Weißbüschelaffen vor. In fast 90 % der Versuche konnte ein Ejakulat gewonnen werden. Diese Erfolgsrate ist mehr als doppelt so hoch wie die Erfolgsrate, die von Kuederling et al. (2000) erzielt wurde (35,2 %) und vergleichbar mit der Rate, die Yeoman et al. (1997) beim Totenkopffaffen beschrieben haben. Es wurde eine hohe Erfolgsquote selbst bei Tieren erzielt, von denen mit dem von Kuederling et al. (2000) beschriebenen Protokoll keine Ejakulate gewonnen werden konnten.

Im Vergleich zu den Arbeiten von Yeoman et al. (1997) und Kuederling et al. (2000) wurde die Stimulationsintensität schneller und in Abhängigkeit der individuellen Reaktion der Tiere gesteigert. Die Verwendung von Auffangröhrchen mit kleinerem Innendurchmesser bewirkte zusätzlich einen besseren und direkteren Kontakt zur *Glans penis*. Zusammen resultierten diese Modifikationen in einer zuverlässigen Ejakulationsauslösung. Trotz der höheren Intensität der Vibration/Stimulation tolerierten die Tiere die Prozedur problemlos. Ein spezielles Training der Tiere war nicht notwendig. Die Tiere müssen lediglich an das in der Hand halten gewöhnt werden. Zudem sollte die Prozedur in einem abgedunkelten Raum, getrennt von anderen Tieren und in ruhiger Atmosphäre durchgeführt werden. Die PVS ist damit eine praktikable Alternative zu anderen Ejakulatgewinnungsmethoden bei Weißbüschelaffen. Ein Bestand von an die menschliche Hand gewöhnten Tieren bietet eine zuverlässige Quelle zur Gewinnung von Ejakulaten mittels PVS.

Zur Gewinnung von Ejakulaten bei *C. jacchus* wurden bisher die RPE und die Vaginalspülung (VW) verwendet. Beide Methoden haben Nachteile. Die Notwendigkeit der Allgemeinanästhesie und die Unzuverlässigkeit sind die Hauptnachteile der RPE (Morrell et al., 1996). Die VW ist arbeits- und zeitintensiv und es ist nicht möglich, mit dieser Methode ein nichtkontaminiertes Ejakulat zu gewinnen (Kuederling et al., 1996). Die PVS dagegen benötigt keine Narkose, bereitet dem Tier kein oder nur wenig Unbehagen und liefert gleichzeitig ein natürliches Ejakulat frei von Kontaminationen.

Zudem liefert die PVS Ejakulate von besserer Qualität als die RPE. Wie in der vorliegenden Arbeit ermittelt wurde, können mittels PVS im Vergleich zur RPE Ejakulate mit weitaus höherer Spermatozoenkonzentration und Anzahl Spermatozoen pro Ejakulat gewonnen werden. Auch der Anteil lebender und motiler Spermatozoen war in den PVS-Ejakulaten deutlich höher. Besonders bemerkenswert ist, dass alle mittels PVS gewonnenen Ejakulate Spermatozoen enthielten, während sich in einem hohen Anteil der RPE-Ejakulate keine oder keine nutzbare Menge Spermatozoen fanden. Diese Ergebnisse entsprechen den von Yeoman et al. (1997) bei Totenkopffaffen ermittelten Befunden.

Auch Studien bei anderen Primatenspezies haben gezeigt, dass natürlich ejakulierte Samenproben im Vergleich zu mittels RPE-gewonnenen Ejakulaten mehr Spermatozoen enthalten (Young et al., 1995; Gould & Young, 1996; Gould & Mann, 1988; Schaffer et al., 1989b). Die Gründe dafür sind in der unkoordinierten Stimulation der für die Ejakulation zuständigen Nervenbahnen und muskulären Strukturen durch die RPE zu suchen. Unvollständige Beförderung von Spermatozoen aus dem Nebenhoden in die ausführenden Wege sowie die höhere Wahrscheinlichkeit des Verlustes von Spermatozoen in die Blase durch retrograde Ejakulation (Schaffer et al., 1989a, Schaffer et al., 1989b; Schaffer et al., 1991) können die Folge sein.

Damit verbunden sind auch Unterschiede in der Zusammensetzung des Seminalplasmas. Young et al. (1995) und Yeoman et al. (1998) haben Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung zwischen mittels RPE gewonnenen Ejakulaten und natürlich ejakulierten Samenproben gefunden.

In der vorliegenden Arbeit waren deutliche, makroskopisch erkennbare Unterschiede in der Beschaffenheit der Ejakulatkoagula zu erkennen. In den RPE-Ejakulaten war das Koagulum in vielen Fällen sehr fest und konnte das gesamte Ejakulat erfassen, so dass keine freien, nutzbaren Spermatozoen gewonnen werden konnten.

Für praktische Anwendungen ist eine höhere Ausbeute von nutzbaren Spermatozoen, wie sie mit der PVS erreicht werden konnte, bei Spezies mit extrem kleinen Ejakulaten von besonderer Bedeutung.

Wie die Analyse der kinematischen Parameter mittels CASA gezeigt hat, sind Unterschiede zwischen den beiden Gewinnungsmethoden nicht nur im prozentualen Anteil motiler Spermatozoen, sondern auch in der Qualität der

Spermatozoenbeweglichkeit zu finden. Spermatozoen in mittels RPE gewonnenen Ejakulaten schwammen auf einer gekrümmteren Bewegungsbahn als die Spermatozoen der PVS-Ejakulate. Dieses Ergebnis stimmt mit einer Untersuchung von Spermatozoen in Ejakulaten von Schimpansen überein, die mittels künstlicher Vagina und RPE gewonnen wurden (Gould & Young, 1996).

Die genaue Ursache für dieses Untersuchungsergebnis ist nicht bekannt. Wahrscheinlich sind Unterschiede in der Zusammensetzung des Seminalplasmas und im Ablauf des Vermischens der Sekrete der akzessorischen Geschlechtsdrüsen während der Ejakulation die Hauptursache (Young et al., 1995; Yeoman et al., 1996).

Im Verlauf der Kapazitiering ändert sich das Bewegungsmuster der Spermatozoen in charakteristischer Weise. Eine zunehmende Krümmung der Bewegungsbahn von Spermatozoen steht in Verbindung mit fortgeschrittener Kapazitiering und wird als Hyperaktivierung bezeichnet (Yanagimachi, 1970; Burkman, 1995; Gould & Young, 1996; Mortimer, 1997). Hyperaktivierte Spermatozoen schwimmen aufgrund eines asymmetrischen Schlags der Geißel auf zirkulären Bahnen, während sich frisch ejakulierte Spermatozoen linear bewegen (Suarez et al., 1983; Mortimer, 1997). Hyperaktivierung wurde bei allen untersuchten Säugetierspermatozoen gefunden. Es bestehen bei allen Spezies eine Reihe von Ähnlichkeiten im Bewegungsmuster, wenngleich es auch speziesspezifische Unterschiede gibt. Allen gemeinsam ist aber eine hohe VCL (*curvilinear velocity*, Spurgeschwindigkeit, $\mu\text{m/s}$) und ALH (*amplitude of lateral head displacement*, seitliche Kopfauslenkung, μm) sowie eine niedrige Linearität (*linearity*, VSL/VCL) (Mortimer, 1997).

In der vorliegenden Studie bewegten sich die mittels PVS gewonnenen Spermatozoen im Durchschnitt schneller und linearer als die mittels RPE gewonnenen. Die Parameter der Spermatozoengeschwindigkeit sowie die Parameter, die die Krümmung der Bewegungsbahn beschreiben, waren bei den beiden Gewinnungsmethoden signifikant verschieden (VCL; VAP; VSL; LIN; STR). Die Werte der Parameter, welche die Bewegung bzw. Auslenkung des Spermatozookopfes während der Vorwärtsbewegung beschreiben, waren dagegen ähnlich. Darunter befand sich auch die ALH (ALH, BCF, MAD).

Ob die Unterschiede im Bewegungsmuster der Spermatozoen aufgrund fortgeschrittener Kapazitierang oder einer anderen negativen Beeinflussung auftraten ist nicht klar.

Da aber auch die Hyperaktivierung mit einer Verminderung der Lebenszeit der Spermatozoen *in vitro* verbunden ist (Gould & Young, 1996; Boatman & Bavister, 1984; Ginsburg et al., 1989), unterstreichen diese Untersuchungen die bessere Qualität der mittels PVS gewonnenen Ejakulate und Spermatozoen.

6. Zusammenfassung

Die Verfügbarkeit ausreichender Mengen von Spermatozoen guter Qualität ist ein Faktor, der die reproduktionsbiologische Forschung sowie die Entwicklung assistierender Reproduktionstechniken bei Primaten stark einschränkt. Als Routinemethode bei Primaten gilt die Elektroejakulation unter Verwendung von Rektalsonden (*rectal probe electroejaculation*, RPE). Insbesondere bei den größeren Altweltaffen ist die RPE oft angewendet worden. Aufgrund ihrer geringen Körpergröße ist die RPE bei den kleinen Spezies südamerikanischer Krallenaffen schwierig durchzuführen. Bislang gibt es kaum Untersuchungen zur Anwendung der RPE bei Krallenaffen und Studien, die durchgeführt wurden, sind auf *Callithrix jacchus* beschränkt. Die Erfolgsquoten waren dabei jedoch sehr unterschiedlich.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Methoden der RPE bei Krallenaffen untersucht. Bei drei Vertretern, *Callithrix jacchus*, *Saguinus fuscicollis* und *Saguinus oedipus*, wurden verschiedene Optionen bezüglich Narkose, Rektalsondengeometrie und elektrischer Stimulation geprüft. Es konnte eine sichere und zuverlässige Methode der RPE für Krallenaffen etabliert werden. Zum ersten Mal wird damit eine erfolgreiche Methode der RPE bei Vertretern der Gattung *Saguinus* beschrieben. Für alle drei Spezies wurden darüber hinaus spermatologische Basisdaten ermittelt sowie kinematische Parameter mittels CASA (*computer assisted sperm analysis*) untersucht. Alle drei Spezies zeichnen sich durch ein extrem kleines Ejakulatvolumen aus. Die dadurch bedingte geringe Anzahl Spermatozoen pro Ejakulat schränken die Nutzbarkeit der Ejakulate stark ein.

Eine vielversprechende Alternative zur RPE ist die Stimulation des Penis durch Vibration (*penile vibratory stimulation*, PVS). PVS wurde bislang erfolgreich zur Ejakulatgewinnung von Totenkopffaffen angewendet. Bei einer ersten Anwendung der PVS bei *C. jacchus* konnte allerdings nur eine niedrige Erfolgsquote erzielt werden. Die vorliegende Arbeit beschreibt ein verbessertes Protokoll für die PVS bei *C. jacchus*. Es wurde eine Erfolgsrate von fast 90 % erreicht. Darüber hinaus waren Ejakulate, die mittels PVS gewonnen wurden, im Vergleich zu RPE-Ejakulaten von besserer Qualität. PVS-Ejakulate enthielten deutlich mehr Spermatozoen und einen höheren Anteil an motilen Spermatozoen. Die Untersuchung der kinematischen

Parameter mittels CASA weisen auch auf funktionelle Unterschiede hin zwischen Spermatozoen welche mittels PVS und RPE gewonnen wurden. Spermatozoen in RPE-Ejakulaten bewegten sich auf weniger linearen Bahnen als Spermatozoen in PVS-Ejakulaten.

7. Summary

The availability of sufficient amounts of spermatozoa of high quality is one of the main limiting factors in reproductive research and development of reproductive technologies in primates. Whereas rectal probe electroejaculation (RPE) has been extensively used for collecting semen in the larger Old World species, this approach is difficult to achieve in the small-bodied New World monkeys of the family Callitrichidae. Only a few studies on application of RPE in Callitrichidae have been described, but all were restricted to one species, the common marmoset (*Callithrix jacchus*). In these studies, achieved success rates were markedly different.

In the present study, different methods of RPE were evaluated in three species of Callitrichidae, including the marmoset (*C. jacchus*) as well as two tamarin species (*Saguinus fuscicollis*, *S. oedipus*). Parameters evaluated were method of anaesthesia, rectal probe geometry, and electric stimulation pattern. A safe and reliable method for collection of semen with a high success rate could be established. In addition, for all three species, information on seminal characteristics are provided, including analysis of kinematic parameters by computer assisted semen analysis (CASA). Ejaculate volume in callitrichids was found to be extremely small and low numbers of total spermatozoa in RPE collected ejaculates limits its use for research or other purposes.

A promising alternative to RPE is the method of penile vibratory stimulation (PVS). Currently, PVS has been successfully used in semen collection in the squirrel monkey, but with a poor success rate in the marmoset. The present study reports on an improved protocol for PVS in the marmoset with a success rate of almost 90%. Ejaculates obtained by PVS were of enhanced quality compared to those obtained by RPE. PVS ejaculates contained on average three to four fold higher numbers of total and motile spermatozoa. Assessment of sperm kinematics using CASA suggested also functional differences between spermatozoa collected by PVS and RPE as marmoset spermatozoa in samples obtained by RPE swim in a more convoluted manner compared with those obtained by PVS.

8. Literaturverzeichnis

Abbott D.H., Hearn J.P. (1978)

Physical, hormonal and behavioural aspects of sexual development in the marmoset monkey, *Callithrix jacchus*. J Reprod Fertil 53: 155-166.

Alipour M., Chen Y., Jurgens U. (2002)

Anterograde projections of the motocortical tongue area in the saddle-back tamarin (*Saguinus fuscicollis*). Brain Behav Evol 60 (2): 101-116.

Araujo A., Arruda M.F., Alencar A.I., Albuquerque F., Nascimento M.C., Yamamoto M.E. (2000)

Body weight of wild and captive common marmosets (*Callithrix jacchus*). Int J Primatol 21: 317-324.

Aslam H., Schneiders A., Perret M., Weinbauer G.F., Hodges J.K. (2002)

Quantitative assessment of testicular germ cell production and kinematic and morphometric parameters of ejaculated spermatozoa in the grey mouse lemur, *Microcebus murinus*. Reproduction 123: 323-332.

Aumüller G. (1991)

Zentrale Steuerung von Erektion und Ejakulation. In: Krause W., Rothauge C.-F. Andrologie. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart. 27.

Bader H. (1983)

Electroejaculation in chimpanzees and gorillas and artificial insemination in chimpanzees. Zoo Biology 2: 307-314.

Ball L. (1976)

Electroejaculation. In: Klemm W.R. Applied electronics for veterinary medicine and animal physiology. Charles Thomas Publisher, Springfield. 394-441.

Ballou J.D., Kleiman D.G., Mallinson J.J.C., Rylands A.B., Valladares-Padua C.B., Leus K. (2002)

History, management, and conservation role of the captive lion tamarin population. In: Kleiman D.G., Rylands A.B. (eds.). Lion tamarins: biology and conservation. Smithsonian Institution Press, Washington. 95-114.

Bavister B.D., Boatman D.E. (1989)

In vitro fertilization and embryo transfer technology as an aid to the conservation of endangered primates. Zoo Biol Suppl 1: 21-31.

Beckerman H., Becher M.D., Lankhorst G.J. (1993)

The effectiveness of vibratory stimulation in anejaculatory men with spinal cord injury. Paraplegia 31: 689-699.

- Bedford J.M. (1974)
Biology of primate spermatozoa. *Contrib Primat* 3: 97-139.
- Beehler B.A., Piper A., Jacobs S.C., Clowry L.J. (1982)
Post-mortem collection of sperm from a lowland gorilla. *Ann Proc Am Ass Zoo Vet*: 56-57.
- Bennett J.P. (1967)
Semen collection in the squirrel monkey. *J Reprod Fertil* 13: 353-355.
- Boatman D.E., Bavister B.D. (1984)
Stimulation of rhesus monkey sperm capacitation by cyclic nucleotide mediators. *J Reprod Fertil* 71: 357-366.
- Boersma A., Uhlenbrock S., Stolla R. (1999)
Assessment of morphometric criteria for normal stallion sperm heads by computer-assisted sperm analysis (CASA). *Reprod Domest Anim* 34: 14.
- Bornman M.S., van Vuuren M., Meltzer D.G.A., van der Merwe C.A., van Rensburg S.J. (1988)
Quality of semen obtained by electroejaculation from chacma baboons (*Papio ursinus*). *J Med Primatol* 17: 57-61.
- Boyers S.P., Davis R.O., Katz D.F.. (1989)
Automated semen analysis. In: Barbieri R.L. (ed.). *Current Problems in Obstetrics, Gynaecology and Fertility*. Year Book Medical Publishers Inc, Chicago. 169-200.
- Brack M., Göltenboth R., Rietschel W. (1995)
Primaten. In: Göltenboth R., Klös H.-G. (eds.). *Krankheiten der Zoo- und Wildtiere*. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin. 25-60.
- Brackett N.L. (1999)
Penile vibratory stimulation of men with spinal cord injury. *Hum Reprod Update* 5: 551-552.
- Broadmeadow A., Gower A. (2000)
The use of common marmosets in biomedical research. *Toxicology Letters* 116 (Suppl. 1), 60.
- Brown C.S., Loskutoff N.M. (1998)
A training program for non-invasive semen collection in captive western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*). *Zoo Biology* 17: 143-151.
- Burkman L.J. (1995)
The motility of human spermatozoa before and after capacitation. In: Grudzinskas JG, Yovich JL. *Gametes – The spermatozoon*. Cambridge University Press, Cambridge. 122-139

- Chen J.J., Smith E.R., Gray G.D., Davidson J.M. (1981)
Seasonal changes in plasma testosterone and ejaculatory capacity in squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Primates* 22: 253-260.
- Chowdhury A.K., Marshall G.R. (1980)
Irregular pattern of spermatogenesis in the baboon (*Papio anubis*) and its possible mechanism. In: Steinberger A., Steinberger E. (eds.). *Testicular Development, Structure and Function*. Raven Press, New York. 129-137.
- Chudy M., Stahl-Hennig C., Berger A., Nubling C.M., Hunsmann G., Rabenau H.F., Lower J. (2002)
Hepatitis A virus infection in tamarins: experimental transmission via contaminated factor VIII concentrates. *J Infect Dis* 185: 1170-1173.
- Clapp N.K., Lushbaugh C.C., Humason G.L., Gangaware B.L., Henke M.A. (1985)
Natural history and pathology of colon cancer in *Saguinus oedipus oedipus*. *Dig Dis Sci* 30 (12 Suppl): 107S-113S.
- Clermont Y., Antar M. (1973)
Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and the spermatogonial renewal in the monkey *Macaca arctoides*. *Am J Anat* 136: 153-165.
- Clermont Y., Lebold P. (1959)
Differentiation and renewal of spermatogonia in the monkey, *Macaca rhesus*. *Am J Anat* 104: 237-273.
- Cooper T.G., Yeung, C.H. (1999)
Sperm maturation in the primate epididymis. In: Weinbauer G.F., Korte R. (eds.). *Reproduction in nonhuman primates*. Waxmann Verlag, Münster. 61-78.
- Cranfield M. R., Bavister B.D., Boatman D.E., Berger N.G., Schaffer N., Kempske S.E., Ialleggio D.M., Smart J. (1993)
Assisted reproduction in the propagation management of the endangered lion-tailed macaques (*Macaca silenus*). In: Wolf, D.P. (ed.). *In vitro fertilization and embryo transfer in primates*. Springer, New York. 331-348.
- Cranfield M.R., Kempske S.E., Schaffer N. (1988)
The use of *in vitro* fertilisation and embryo transfer techniques for the enhancement of genetic diversity in the captive population of the lion-tailed macaque. *Int Zoo Yb* 27: 149-159.
- Cui K., Flaherty S.P., Newble C.D., Guerin M.V., Napier A., Matthews C.D. (1991)
Collection and analysis of semen from the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *J Androl* 12: 214-220.
- Davis R.O., Gravance C.G., Casey P.J. (1993)
Automated morphometric analysis of stallion spermatozoa. *Am J Vet Res* 54: 1808-1811.

Davis R.O., Thal D.M., Bain D.E., Andrew J.B., Siemers R.J., Gravance C.G. (1992)
Accuracy and precision of the CellForm-Human automated sperm morphometry instrument. *Fertil Steril* 58: 763-769.

Denis L.T., Poindexter A.N., Ritter M.B., Seager S.W.J., Deter R.L. (1976)
Freeze preservation of squirrel monkey sperm for use in timed fertilization studies. *Fertility and Sterility* 27: 723-729.

Dietrich T., Schulze W., Riemer M. (1986)
Classification of the germinal epithelium in Java monkeys (*Macaca cynomolgus*) using digital processing. *Urologe* 15: 179-186.

Dixson A.F. (1998)
Primate classification and evolution. In: Dixson A.F. (ed.). *Primate sexuality: comparative studies of the prosimians, monkeys, apes, and human beings*. Oxford University Press, Oxford. 5-21.

Dooley M.P., Pineda M.H., Hopper J.G., Hsu W.H. (1991)
Retrograde flow of spermatozoa into the urinary bladder of cats during electroejaculation, collection of semen with an artificial vagina, and mating. *Am J Vet Res* 52: 687-691.

Durrant B.S. (1990)
Semen collection, evaluation, and cryopreservation in exotic animal species: maximizing reproductive potential. *ILAR News* 32: 2-10.

Fortman J.D., Hewett T.A., Bennett B.T. (2002)
The laboratory nonhuman primate. CRC Press, Boca Raton. 1-34.

Frey H.-H., Schulz R., Werner E. (1996)
Pharmakologie des Zentralen Nervensystems (ZNS). In: Frey H.-H., Löscher W. (Hrsg.) *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart. 139-202.

Fussell E.N., Franklin L.E., Franta R.C. (1973)
Collection of chimpanzee semen with an artificial vagina. *Lab Anim Sci* 23: 252-255.

Fussell E.N., Roussel J.D., Austin C.R. (1967)
Use of the rectal probe method for electrical ejaculation of apes, monkeys and a prosimian. *Lab Anim Care* 17: 528-530.

Gago C., Pérez-Sánchez F., Yeung C.H., Tablado L., Cooper T.C., Soler C. (1999)
Morphological characterisation of ejaculated cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) sperm. *Am J Primatol* 47: 105-115.

Garrett C., Baker H.W.G. (1995)
A new fully automated system for the morphometric analysis of human sperm heads. *Fertil Steril* 63: 1306-1317.

- Gilchrist R.B., Nayudu P.L., Hodges J.K. (1997)
Maturation, fertilisation, and development of marmoset monkey oocytes *in vitro*. Biol Reprod 56: 238-246.
- Gilchrist R.B., Wicherek M., Heistermann M., Nayudu P.L., Hodges J.K. (2001)
Changes in follicle-stimulating hormone and follicle population during the ovarian cycle of the common marmoset. Biol Reprod 64: 127-135.
- Gilman S.C. (1969)
Relationship between internal resistance, stimulation voltage, and electroejaculation in the pigtail monkey (*Macaca nemestrina*): a preliminary report. Lab Anim Care 19: 800-803.
- Ginsburg K.A., Sacco A.G., Moghissi K.S., Sorovetz S. (1989)
Variations of movement characteristics with washing and capacitation of spermatozoa. I. Univariate statistical analysis and detection of sperm hyperactivation. Fertil Steril 51: 869-873.
- Gould K.G. (1990)
Techniques and significance of gamete collection and storage in the great apes. J Med Primatol 19: 537-551.
- Gould K.G., Mann D.R.. (1988)
Comparison of electrostimulation methods for semen recovery in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). J Med Primatol 17: 95-103.
- Gould K.G., Martin D.E. (1986)
Artificial insemination of nonhuman primates. In: Benirschke K. (ed.). Primates, the road to self-sustaining populations. Springer-Verlag, New York. 425-443.
- Gould K.G., Warner H., Martin D.E. (1978)
Rectal probe electroejaculation of primates. J Med Primatol 7: 213-222.
- Gould K.G., Young L.G. (1996)
Functional parameters of chimpanzee (*Pan troglodytes*) sperm from ejaculates collected by rectal probe electrostimulation and by artificial vagina. Am J Primatol 39: 115-122.
- Gould K.G., Young L.G., Smithwick E.B., Phythyon S.R. (1993)
Semen characteristics of the adult chimpanzee (*Pan troglodytes*). Am J Primatol 29: 221-232.
- Gravance C.G., Champion Z., Liu I.K.M., Casey P.J. (1997)
Sperm head morphometry analysis of ejaculate and dismount stallion semen samples. Anim Reprod Sci 47: 149-155.
- Gravance C.G., Davis R.O. (1995)
Automated sperm morphometry analysis (ASMA) in the rabbit. J Androl 16: 88-93.

- Haider S.G., Passia D., Treiber A., Millhorst S. (1989)
Description of eight phases of spermiogenesis in the marmoset testis. *Acta Anat* 135: 180-184.
- Harrison R.M. (1980)
Semen parameters in *Macaca mulatta*: Ejaculates from random and selected monkeys. *J Med Primatol* 9: 265-273.
- Harrison R.M., Lewis R.W. (1986)
The male reproductive tract and its fluids. In: Dukelow W.R., Erwin, J. (eds.). *Comparative Primate Biology. Volume 3: Reproduction and Development*. Alan R. Liss Inc., New York. 101-148.
- Hearn J.P. (1983)
The common marmoset (*Callithrix jacchus*). In: Hearn J.P. (ed.). *Reproduction in New World Primates*. MTP-Press, Lancaster. 181-215.
- Hearn J.P. (1994)
New World primates for research in human reproduction health. *Am J Primatol*, 34: 11-17.
- Hearn J.P. (1995)
Marmosets and tamarins. In: Rollin B.E., Kesel M.L. (eds). *The experimental animal in biomedical research. Volume II*. CRC Press, Boca Raton. 483-493.
- Hershkovitz, P. (1977)
Living New World Primates (Platyrrhini). The University of Chicago Press, Chicago.
- Heymann E.W. (1997)
Aspekte der Verhaltensbiologie von Schnurrbarttamarinen, *Saguinus mystax* (Callitrichinae; Cebidae; Primates) in ökologischer, evolutionärer und phylogenetischer Perspektive. Habilitationsschrift. Gießen.
- Heymann E.W., Knogge C., Tirado E.R., Smith A.C. (1998)
Unter Affengnommen im Amazonasregenwald - Freilandforschung an Tamarinen in Peru. *Zeitschrift des Kölner Zoo* 41: 63-84.
- Hilton-Taylor, C. (2000)
2000 IUCN Red list of threatened species. IUCN Publications Services Unit, Cambridge.
- Hirai M., Boersma A., Aumüller R., Braun J. (1999)
Computer-assisted sperm morphology and motility analysis related to non return rate and litter size in AI boars. *Reprod Domest Anim* 34: 27.
- Hodges J.K. (1988)
The detection of ovulation and timing of pregnancy. In: Neubert D., Merker H.J., Hendrickx, A.G. (eds). *Non-human primates - developmental biology and toxicology*. Ueberreuter Wissenschaft, Wien Berlin. 83-87.

- Holt W.V., Bennett P.M., Volobouev V. (1996)
Genetic resource banks in wildlife conservation. J Zool Lond 238: 531-544.
- Holt W.V., Palomo M.L. (1996)
Optimisation of a continuous real-time computerised semen analysis system for ram sperm motility assessment, and evaluation of four methods of semen preparation. Reprod Fertil Dev 8: 219-230.
- Hoskins D.D., Patterson D.L. (1967)
Prevention of coagulum formation with recovery of motile spermatozoa from rhesus monkey semen. J Reprod Fertil 13:337-340.
- Howard J., Bush M., Wildt D.E. (1986)
Semen collection, analysis and cryopreservation in nondomestic mammals. In: Morrow D.A. (ed.). Current Therapy in Theriogenology 2. W.B. Saunders Company, Philadelphia. 1047-1053.
- Kaumanns W., Klensang H., Olfenbüttel T., Rohrerhuber B., Schwibbe M. (1986)
Zur Haltung von Lisztaffen. Zeitschrift des Kölner Zoo 29: 43-62.
- Kendrick K.M., Dixon A.F. (1984)
A quantitative description of copulatory and associated behaviours of captive marmosets (*Callithrix jacchus*). Int J Primatol 5: 199-212.
- Kraemer D.C., Kuehl T.J. (1980)
Semen collection and evaluation of breeding soundness in nonhuman primates. In: Morrow D.A. (ed.). Current Therapy in Theriogenology. W.B. Saunders Company, Philadelphia. 1134-1137.
- Kraemer D.C., Vera Cruz N.C. (1969)
Collection, gross characteristics and freezing of baboon semen. J Reprod Fertil 20: 345-348.
- Krause W. (1991)
Untersuchung des Ejakulates. In: Krause W, Rothauge C-F. Andrologie. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart. 52-66.
- Kruger T.F., Oehninger S., Du Toit T.C., Menkveld R., Franken D.R., Lombard C.J., Acosta A.A. (1993)
A new computerised method of reading sperm morphology (strict criteria) is as efficient as technician reading. Fertil Steril 59: 202-209.
- Kudlac, E. (1991)
Neuroendokrine Regulation der Sexualfunktion bei männlichen Tieren. In: Busch W., Löhle K., Peter W. Künstliche Besamung bei Nutztieren. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart. 162-163.

- Kuederling I., Heistermann M. (1997)
Ultrasonographic and hormonal monitoring of pregnancy in the saddle back tamarin, *Saguinus fuscicollis*. J med Primatol 26: 299-306.
- Kuederling I., Morrell J.M., Nayudu P.L. (1996)
Collection of semen from marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*) for experimental use by vaginal washing. Lab Anim 30: 260-266.
- Kuederling I., Schneiders A., Sonksen J., Nayudu P.L., Hodges J.K. (2000)
Non-invasive collection of ejaculates from the common marmoset (*Callithrix jacchus*) using penile vibrostimulation. Am J Primatol 52: 149-154.
- Kuehl T.J., Dukelow W.R. (1974)
A restraint device for electroejaculation of squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). Lab Anim Sci 24: 364-366.
- Kumar R.A., Phillips D.M. (1991)
Spermiation and sperm maturation in the marmoset. Anat Rec 229: 315-320.
- Lang C.M. (1967)
A technique for the collection of semen from squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) by electroejaculation. Lab Anim Care 17: 218-221.
- Lanzendorf S.E., Gliessman P.M., Archibong A.E., Alexander M., Wolf P.D. (1990)
Collection and quality of rhesus monkey semen. Mol Reprod Dev 25: 61-66.
- Leigh S.R. (1994)
Relation between captive and noncaptive weights in anthropoid primates. Zoo Biol 13: 21-43.
- Löscher W. (1994)
Pharmaka mit Wirkung auf das Zentralnervensystem. In: Löscher W., Ungemach F.R., Kroker R. Grundlagen der Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg. 66-115.
- Marks S.L., Dupuis J., Mickelsen W.D., Memon M.A., Platz C.C. (1994)
Conception by use of *post mortem* epididymal semen extraction in a dog. J Am Vet Med Ass 204: 1639-1640.
- Marshall V.S.; Wilton L.J., Moore H.D. (1998)
Parthenogenetic activation of marmoset (*Callithrix jacchus*) oocytes and the development of marmoset parthenogenoms *in vitro* and *in vivo*. Biol Reprod 59: 1491-1497.
- Martin I.C.A. (1978)
The principles and practice of electroejaculation of mammals. Symp Zool Soc Lond 43: 127-152.

Martin R.D. (1990)

A classification of primates. In: Martin R.D. Primate origins and evolution. University Press, Cambridge. 99-101.

Mastroianni L., Manson W.A. (1963)

Collection of monkey semen by electroejaculation. Proc Soc Exp Biol Med 112: 1025-1027.

Menkveld R., Stander F.S.H., Kotze T.J.W., Kruger T.F., van Zyl J.A. (1990)

The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. Hum Reprod 5: 586-592.

Merilan C.P., Read B.W., Boever W.J. (1982)

Semen collection procedures for captive wild animals. Int Zoo Yb 22: 241-244.

Miraglia T., Filho M.T., Branco A.L.C. (1970)

The male reproductive system of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). Acta Anat 76: 594-611.

Mittermeier R.A.; Konstant W.R., Rylands A.B. (2000)

The world's top 25 most endangered primates. Neotropical Primates 8: 49.

Morrell J.M. (1997a)

Cryopreservation of marmoset sperm (*Callithrix jacchus*). Cryo Letters 18: 45-54.

Morrell J.M. (1997b)

CASA as an aid to selecting sperm suspensions for artificial insemination in *Callithrix jacchus*. Int J Androl 20: 287-296.

Morrell J.M., Hodges J.K. (1998)

Cryopreservation of non-human primate sperm: priorities for future research. Anim Reprod Sci 53: 43-63.

Morrell J.M., Kuederling I., Hodges J.K. (1996)

Influence of semen collection method on ejaculate characteristics in the common marmoset, *Callithrix jacchus*. J Androl 17: 164-172.

Mortimer S.T. (1997)

A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. Hum Reprod Update 3: 403-439.

Nayudu P.L., Wu J., Michelmann H. (2003)

In vitro development of marmoset monkey oocytes by pre-antral follicle culture. Reprod Domest Anim 38: 90-96.

Nowak R.M. (1999)

Marmosets, Tamarins and Goeldi's Monkey. In: Nowak R.M. Walker's Primates of the world. The Johns Hopkins University Press, Baltimore. 117-126.

- Platz C.C., Wildt D.E., Bridges C.H., Seager S.W., Whitlock B.S. (1980)
Electroejaculation and semen analysis in a male lowland gorilla, *Gorilla gorilla gorilla*.
Primates 21: 130-132.
- Ramesh V., Ramachandra S.G., Krishnamurthy H.N., Rao A.J. (1998)
Electroejaculation and seminal parameters in bonnet monkeys (*Macaca radiata*).
Andrologia 30: 97-100.
- Roussel J.D., Austin C.R. (1967)
Enzymatic liquefaction of primate semen. *Int J Fertil* 12: 288-290.
- Roussel J.D., Austin C.R. (1968)
Improved electroejaculation of primates. *J Inst Anim Tech* 19: 22-32.
- Rylands A.B., Coimbra-Filho A.F., Mittermeier R.A. (1993)
Systematics, geographic distribution, and some notes on the conservation status of the
Callitrichidae. In: Rylands A.B. (ed.). *Marmosets and tamarins: systematics, behaviour,
and ecology*. Oxford University Press, Oxford. 11-77.
- Sarason R.L., VandeVoort C.A., Mader D.R., Overstreet J.W. (1991)
The use of non-metal electrodes in electroejaculation of restraint but unanaesthetised
macaques. *J Med Primatol* 20: 122-125.
- Schaffer N.E., Cranfield M., Fazleabas A.T., Jeyendran R.S. (1989a)
Viable spermatozoa in the bladder after electroejaculation of lion-tailed macaques
(*Macaca silenus*). *J Reprod Fertil* 86: 767-770.
- Schaffer N., Cranfield M., Meehan T., Kempske S. (1989b)
Semen collection and analysis in the conservation of endangered nonhuman primates.
Zoo Biology Suppl 1: 47-60.
- Schaffer N., Jeyendran R.S., Beehler B. (1991)
Improved sperm collection from the lowland gorilla: recovery of sperm from bladder and
urethra following electroejaculation. *Am J Primatol* 24: 265-271.
- Schaffer N.E., McCarthy T.J., Fazleabas A.T., Jeyendran R.S. (1992)
Assessment of semen quality in a baboon (*Papio anubis*) breeding colony. *J Med
Primatol* 21: 47-48.
- Schefels W. (1969)
Die Spermagewinnung beim Rüden mit Hilfe eines Vibrators. *Deutsche Tierärztliche
Wochenschrift* 76: 289-290.
- Seier J.V., Fincham J.E., Menkveld R., Venter F.S. (1989)
Semen characteristics of vervet monkey. *Lab Anim* 23: 43-47.
- Seier J.V., Laubscher R. (1996)
Abnormal morphology of vervet monkey sperm. *J Med Primatol* 25: 397-403.

- Settlage D.S.F., Hendrickx A.G. (1974)
Observations on coagulum characteristics of the rhesus monkey electroejaculate. *Biol Reprod* 11: 619-623.
- Seuanez H.N., Carothers A.D., Martin D.E., Short R.V. (1977)
Morphological abnormalities in spermatozoa of man and great apes. *Nature* 270: 345-347.
- Smith R.J., Jungers W.L. (1997)
Body mass in comparative primatology. *J Hum Evol* 32: 523-559.
- Smithwick E.B., Young L.G., Gould K. (1996)
Duration of spermatogenesis and relative frequency of each stage in the seminiferous epithelium cycle of the chimpanzee. *Tissue Cell* 28: 357-366.
- Sojka N.J. (1986)
Management of artificial breeding in cats. In: Morrow D.A.(ed.). *Current Therapy in Theriogenology* 2. W.B. Saunders Company, Philadelphia. 805-808.
- Sonksen J., Biering-Sorensen F., Kristensen J.K. (1994)
Ejaculation induced by penile vibratory stimulation in men with spinal cord injuries. The importance of the vibratory amplitude. *Paraplegia* 32: 651-660.
- Steigerwald P., Krause W. (1998)
Estimation of sperm morphology using a new CASA system. *Andrologia* 30: 23-27.
- Suarez S.S., Katz D.F., Overstreet J.W. (1983)
Movement characteristics and acrosomal status of rabbit spermatozoa recovered at the site and time of fertilisation. *Biol Reprod* 29: 1277-1287.
- Thomson J.A., Iliff-Sizemore S.A., Gliessman P.M., Wolf D.P. (1992)
Collection and fertilization potential of sperm from the sulawesi crested black macaque (*Macaca nigra*). *Am J Primatol* 28: 289-297.
- Tobi M., Chintalapani S., Kithier K., Clapp, N. (2000)
Gastrointestinal tract antigenic profile of cotton-top tamarin, *Saguinus oedipus*, is similar to that of humans with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 45: 2290-2297.
- Valerio D.A., Ellis E.B., Clark M.L., Thompson G.E. (1969)
Collection of semen from macaques by electroejaculation. *Lab Anim Care* 19: 250-252.
- Van Pelt L.F., Keyser P.E. (1970)
Observations on semen collection and quality in macaques. *Lab Anim Care* 20: 726-733.
- VandeVoort C.A., Neville L.E., Tollner T.L., Field L.P. (1993)
Non-invasive semen collection from an adult orang-utan. *Zoo Biology* 12: 257-265.

- Wang C., Ng V., Leung A., Lee K.-F., Tsoi W.-L., Chan S.Y.W., Leung J. (1991)
Computer-assisted assessment of human sperm morphology: comparison with visual assessment. *Fertil Steril* 55: 983-988.
- Warner H., Martin D.E., Keeling M.E. (1974)
Electroejaculation of the great apes. *Ann Biomed Eng* 2: 419-432.
- Watson P.F. (1978)
A review of techniques of semen collection in mammals. *Symp Zool Soc Lond* 43: 97-126.
- Weinbauer G.F., Nieschlag E. (1999)
Testicular physiology of primates. In: Weinbauer G.F., Korte R. (eds.). *Reproduction in nonhuman primates*. Waxmann Verlag, Münster. 13-26.
- Weinbauer G.F., Aslam H., Krishnamurthy H., Brinkworth M.H., Einspanier A., Hodges J.K. (2001)
Quantitative analysis of spermatogenesis and apoptosis in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) reveals high rates of spermatogonial turnover and high spermatogenic efficiency. *Biol Reprod* 64: 120-126.
- Weisbroth S., Young F.A. (1965)
The collection of primate semen by electroejaculation. *Fertil Steril* 16 (2): 229-235.
- Weitze K.F., Müller E. (1991)
Prinzipien der Spermauntersuchung. In: Busch W., Löhle K., Peter W. *Künstliche Besamung bei Nutztieren*. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart. 269-310.
- WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge University Press; Cambridge; 1987.
- WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge University Press; Cambridge; 1992.
- Wilde J., Klensang H., Schwibbe M.H. (1994)
A census for captive primates in Europe and North Africa for 1992. *Primate Report* 38: 2-179.
- Wildt D.E. (1986)
Spermatozoa: collection, evaluation, metabolism, freezing, and artificial insemination. In: Dukelow W.R., Erwin J. (eds.). *Comparative Primate Biology, Volume 3: Reproduction and Development*. Alan R. Liss Inc., New York. 171-193.
- Wildt D.E. (1996)
Male reproduction: assessment, management, and control of fertility. In: Kleiman D.G., Allen M.E., Thompson K.V., Lumpkin S., Harris H (eds.). *Wild mammals in captivity: principles and techniques*. The University of Chicago Press, Chicago. 429-450.

- Wilton L.J., Marshall V.S., Piercy E.C., Moore H.D. (1993)
In vitro fertilisation and embryo development in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). J Reprod Fertil 97: 481-486.
- Yanagimachi R. (1970)
The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. J Reprod Fertil 23: 193-196.
- Yeoman R.R., Ricker R.B., Williams L.E., Sonksen J., Abee C.R. (1997)
Vibratory stimulation of ejaculation yields increased motile spermatozoa compared with electroejaculation in squirrel monkeys (*Saimiri boliviensis*). Contemp Topics (AALAS) 36: 62-64.
- Yeoman R.R., Sonksen J., Gibson S.V., Rizk B.M., Abee C.R. (1998)
Penile vibratory stimulation yields increased sperm and accessory gland production compared with rectal electroejaculation in a neurologically intact primate (*Saimiri boliviensis*). Hum Reprod 13: 2527-2531.
- Yeung C.H., Morrell J.M., Cooper T.G., Weinbauer G.F., Hodges J.K., Nieschlag E. (1996)
Maturation of sperm motility in the epididymis of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) and the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). Int J Androl 19: 113-121.
- Yeung C.H., Weinbauer G.F., Nieschlag E. (1989)
Movement characteristics of ejaculated sperm from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) analysed by manual and automated computerised image analysis. J Med Primatol 18: 55-68.
- Young L.G., Smithwick E.B., Gould K.G. (1995)
Characteristics of chimpanzee (*Pan troglodytes*) ejaculates collected by rectal probe electrostimulation and by artificial vagina. Am J Primatol 35: 293-304.
- Ziegler T.E., Savage A., Scheffler G., Snowdon C.T. (1987)
The endocrinology of puberty and reproductive functioning in female cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*) under varying social conditions. Biol Reprod 37: 618-627.
- Ziegler T.E., Snowdon C.T. (1997)
Role of prolactin in paternal care in a monogamous New World Primate, *Saguinus oedipus*. Annals of the New York Academy of Science 807: 599-601.

9. Anhang

1. Ejakulatuntersuchung *Callithrix jacchus*

1.1 RPE

Makroskopische Ejakulatuntersuchung

Ejakulatgewicht und -volumen aller gewonnenen Ejakulate

Tiernummer	n	Ejakulatgewicht (mg)	Ejakulatvolumen (μ l)
5882	6	46,8 \pm 25,5	45,7 \pm 25,0
6768	7	43,1 \pm 26,4	41,4 \pm 27,3
7407	6	17,9 \pm 11,5	17,8 \pm 11,3
6996	7	51,9 \pm 44,7	48,6 \pm 42,5
5793	9	32,9 \pm 17,2	31,0 \pm 16,9
6907	7	17,3 \pm 11,8	16,0 \pm 10,7
6854	4	29,8 \pm 19,5	28,3 \pm 19,2
		34,6 \pm 26,6	32,9 \pm 25,7

Mittelwerte \pm SD

Nicht alle gewonnenen Ejakulate konnten vollständig analysiert werden. Einige Ejakulate enthielten keine oder nur einzelne Spermatozoen, ein Ejakulat war mit Urin kontaminiert und bei einer Reihe von Ejakulaten blieben alle Spermatozoen im Koagulum eingeschlossen, sodass keine freien, nutzbaren Spermatozoen gewonnen werden konnten. Alle Ejakulate von Tier 6854 waren nicht nutzbar.

Ejakulatgewicht und -volumen der Ejakulate mit vollständiger Analyse

Tiernummer	n	Ejakulatgewicht (mg)	Ejakulatvolumen (μ l)
5882	4	50,5 \pm 26,1	49,5 \pm 25,8
6768	4	52,8 \pm 30,9	51,3 \pm 32,4
7407	4	19,7 \pm 14,3	20,3 \pm 13,7
6996	4	68,9 \pm 53,5	65,3 \pm 50,4
5793	4	32,6 \pm 23,4	30,8 \pm 22,8
6907	4	12,5 \pm 9,2	11,5 \pm 7,9
		39,5 \pm 33,2	38,1 \pm 32,0

Mittelwerte \pm SD

Mikroskopische Ejakulatuntersuchung

Tiernummer	n	Konzentration (x 10 ⁶ /ml)	Anzahl (x 10 ⁶)	lebend (%)	motil (%)
5882	4	112,2 ± 138,0	6,9 ± 9,3	52,6 ± 21,8	43,75 ± 18,0
6768	4	26,1 ± 15,7	1,3 ± 1,0	53,9 ± 15,9	33,00 ± 18,0
7407	4	458,9 ± 537,3	5,5 ± 3,7	78,4 ± 12,0	63,75 ± 14,4
6996	4	66,6 ± 43,8	5,3 ± 7,3	55,3 ± 4,6	28,00 ± 8,9
5793	4	52,0 ± 50,9	1,1 ± 0,6	62,8 ± 11,1	42,00 ± 9,3
6907	4	65,1 ± 71,8	0,7 ± 0,8	62,9 ± 14,8	42,50 ± 19,2
		130,2 ± 254,3	3,5 ± 5,2	60,9 ± 15,5	42,17 ± 17,7

Mittelwerte ± SD

Kinematische Parameter

Tiernummer	n	VCL (µm/s)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	LIN	STR
5882	4	149,3 ± 10,0	113,0 ± 11,1	71,7 ± 11,6	39,8 ± 8,9	54,3 ± 8,7
6768	4	147,4 ± 22,5	103,8 ± 16,2	55,6 ± 14,9	32,1 ± 10,5	47,1 ± 11,9
7407	4	153,8 ± 27,2	117,5 ± 33,7	75,2 ± 24,1	43,6 ± 7,5	59,2 ± 4,8
6996	4	139,2 ± 20,2	99,2 ± 11,3	56,8 ± 13,7	34,9 ± 8,0	50,7 ± 10,5
5793	4	141,7 ± 30,7	93,4 ± 15,3	58,1 ± 13,3	36,6 ± 11,2	57,6 ± 15,5
6907	4	150,8 ± 20,5	121,3 ± 20,2	82,2 ± 27,7	44,7 ± 14,3	57,1 ± 14,7
		147,0 ± 20,8	108,1 ± 20,1	66,6 ± 19,5	38,6 ± 10,2	54,3 ± 11,1

Mittelwerte ± SD

Tiernummer	n	MAD (°)	BCF (Hz)	ALH (µm)
5882	4	41,3 ± 7,1	8,3 ± 1,7	6,52 ± 1,1
6768	4	46,0 ± 9,8	11,3 ± 3,5	6,19 ± 1,0
7407	4	36,5 ± 7,6	5,7 ± 2,1	10,62 ± 1,8
6996	4	42,7 ± 3,8	8,8 ± 4,2	6,63 ± 1,0
5793	4	43,5 ± 3,6	12,8 ± 3,4	6,24 ± 2,7
6907	4	37,9 ± 8,8	8,6 ± 2,9	5,80 ± 1,1
		41,3 ± 8,7	9,2 ± 3,6	7,00 ± 2,2

Mittelwerte ± SD

4 Ejakulate pro Tier und 300 Spermatozoenbahnen pro Ejakulat wurden analysiert.

Spermatozoenmorphologie

Morphometrie

Tiernummer	n	Kopflänge (µm)	Kopfbreite (µm)	L/B	Schwanzlänge (µm)	Gesamtlänge (µm)
5882	200	5,14 ± 0,26	3,38 ± 0,16	1,52 ± 0,10	50,78 ± 2,03	55,92 ± 2,09
6768	200	5,24 ± 0,30	3,47 ± 0,18	1,51 ± 0,09	52,57 ± 2,08	57,81 ± 2,14
7407	200	5,12 ± 0,28	3,26 ± 0,20	1,58 ± 0,12	55,37 ± 4,01	60,48 ± 4,02
6996	200	5,12 ± 0,33	3,23 ± 0,24	1,59 ± 0,13	49,89 ± 2,10	54,99 ± 2,17
5793	200	4,71 ± 0,25	3,41 ± 0,16	1,39 ± 0,09	49,03 ± 1,61	53,74 ± 1,64
6907	200	5,14 ± 0,29	3,31 ± 0,23	1,56 ± 0,13	53,56 ± 4,47	58,71 ± 4,50
		5,08 ± 0,33	3,34 ± 0,22	1,52 ± 0,13	51,84 ± 3,65	56,92 ± 3,74

Mittelwerte ± SD

200 Spermatozoen pro Tier wurden vermessen

Pathomorphologie

Tiernummer	n	Defekte gesamt (%)	Kopfdefekte (%)	Hals/ Mittelstück (%)	Schwanz- defekte (%)	cytopl. Tropfen (%)
5882	4	23,1 ± 6,8	4,1 ± 1,4	5,5 ± 1,8	13,1 ± 4,0	0,4 ± 0,8
6768	4	11,9 ± 0,8	1,6 ± 0,9	4,9 ± 1,8	5,1 ± 1,3	0,3 ± 0,5
7407	4	33,5 ± 6,9	6,3 ± 1,9	11,9 ± 2,8	14,6 ± 3,9	0,8 ± 1,2
6996	4	29,9 ± 9,3	4,4 ± 3,6	10,8 ± 5,3	13,4 ± 4,9	1,4 ± 1,1
5793	4	28,0 ± 5,5	5,9 ± 4,5	8,5 ± 1,6	13,4 ± 3,8	0,3 ± 0,3
6907	4	27,6 ± 8,5	8,4 ± 4,8	8,3 ± 3,9	10,5 ± 2,9	0,5 ± 0,6
		25,7 ± 9,3	5,1 ± 3,6	8,3 ± 3,8	11,7 ± 4,6	0,6 ± 0,8

Mittelwerte ± SD

1.2 PVS

Makroskopische Ejakulatuntersuchung

Tiernummer	n	Ejakulatgewicht (mg)	Ejakulatvolumen (μ l)
7039	6	23,9 \pm 10,2	21,7 \pm 10,0
6733	6	18,7 \pm 5,9	16,8 \pm 5,8
5886	6	22,4 \pm 6,5	20,8 \pm 6,4
6521	6	26,0 \pm 18,4	25,8 \pm 16,1
6724	6	16,7 \pm 4,3	15,0 \pm 3,9
7046	6	33,4 \pm 5,9	30,8 \pm 5,2
		23,5 \pm 10,6	21,8 \pm 9,9

Mittelwerte \pm SD

Mikroskopische Ejakulatuntersuchung

Tiernummer	n	Konzentration ($\times 10^6$ /ml)	Anzahl ($\times 10^6$)	lebend (%)	motil (%)
7039	6	318,0 \pm 160,9	7,1 \pm 4,5	72,5 \pm 13,8	48,5 \pm 26,5
6733	6	699,9 \pm 489,6	10,8 \pm 6,3	77,6 \pm 16,7	62,8 \pm 16,2
5886	6	1672,8 \pm 935,9	30,6 \pm 13,3	56,8 \pm 15,5	36,2 \pm 17,0
6521	6	396,1 \pm 237,7	9,5 \pm 7,4	79,7 \pm 19,9	70,8 \pm 18,4
6724	6	448,4 \pm 232,1	7,0 \pm 4,8	80,4 \pm 9,9	63,8 \pm 19,9
7046	6	394,8 \pm 193,6	12,6 \pm 6,9	74,7 \pm 20,3	59,2 \pm 23,2
		655,0 \pm 641,9	12,9 \pm 10,9	73,6 \pm 17,2	56,9 \pm 22,2

Mittelwerte \pm SD

Kinematische Parameter

Tiernummer	n	VCL (μ m/s)	VAP (μ m/s)	VSL (μ m/s)	LIN	STR
7039	6	172,6 \pm 27,0	137,1 \pm 29,8	100,9 \pm 28,3	53,7 \pm 7,7	68,5 \pm 4,8
6733	6	152,4 \pm 30,9	117,6 \pm 37,8	80,5 \pm 29,4	46,3 \pm 12,2	61,8 \pm 5,8
5886	6	145,1 \pm 29,4	105,7 \pm 28,1	66,0 \pm 22,9	40,9 \pm 9,8	56,8 \pm 7,9
6521	6	180,8 \pm 14,9	144,3 \pm 13,5	108,0 \pm 9,6	55,8 \pm 6,8	69,8 \pm 5,7
6724	6	181,5 \pm 30,4	152,2 \pm 31,1	109,9 \pm 30,5	56,0 \pm 12,5	67,0 \pm 10,7
7046	6	174,2 \pm 21,9	149,9 \pm 21,6	113,7 \pm 19,5	61,2 \pm 8,9	71,2 \pm 6,9
		167,7 \pm 28,2	134,5 \pm 31,3	96,5 \pm 28,7	52,3 \pm 11,4	65,9 \pm 8,4

Mittelwerte \pm SD

Tiernummer	n	MAD ($^\circ$)	BCF (Hz)	ALH (μ m)
7039	6	30,6 \pm 3,8	10,7 \pm 2,3	7,1 \pm 0,7
6733	6	38,9 \pm 12,5	8,6 \pm 3,5	7,3 \pm 1,8
5886	6	38,7 \pm 9,6	7,7 \pm 2,6	8,3 \pm 1,3
6521	6	31,9 \pm 4,1	13,5 \pm 2,6	7,2 \pm 1,7
6724	6	29,4 \pm 7,7	9,1 \pm 5,4	8,3 \pm 3,9
7046	6	27,9 \pm 7,6	7,8 \pm 3,5	7,5 \pm 2,8
		32,9 \pm 7,2	9,6 \pm 3,8	7,6 \pm 2,2

Mittelwerte \pm SD

6 Ejakulate pro Tier und 300 Spermatozoenbahnen pro Ejakulat wurden analysiert.

Spermatozoenmorphologie

Pathomorphologie

Tiernummer	n	Defekte gesamt (%)	Kopfdefekte (%)	Hals/ Mittelstück (%)	Schwanz- defekte (%)	cytopl. Tropfen (%)
7039	6	32,6 ± 13,6	4,3 ± 2,4	11,9 ± 4,0	16,3 ± 12,9	0,1 ± 0,2
6733	6	43,8 ± 21,1	4,8 ± 4,6	18,4 ± 6,2	20,3 ± 18,1	0,3 ± 0,5
5886	6	61,0 ± 21,1	5,5 ± 2,0	38,3 ± 15,5	17,2 ± 7,5	0,1 ± 0,2
6521	6	22,8 ± 16,0	6,4 ± 1,9	10,4 ± 10,9	5,7 ± 4,9	0,3 ± 0,4
6724	6	23,9 ± 5,9	7,7 ± 2,7	11,3 ± 4,7	4,9 ± 2,5	0,0 ± 0,0
7046	6	18,8 ± 5,1	6,2 ± 2,4	8,2 ± 3,2	4,5 ± 1,5	0,0 ± 0,0
Mittelwerte ± SD		33,8 ± 20,5	5,8 ± 2,8	16,4 ± 13,1	11,5 ± 11,3	0,1 ± 0,3

2. Ejakulatuntersuchung *Saguinus fuscicollis*

2.1 RPE

Makroskopische Ejakulatuntersuchung

Ejakulatgewicht und -volumen aller gewonnenen Ejakulate

Tiernummer	n	Ejakulatgewicht (mg)	Ejakulatvolumen (μ m)
8172	6	29,3 \pm 28,9	28,2 \pm 26,9
7815	7	17,5 \pm 7,1	16,4 \pm 6,8
8249	7	14,2 \pm 9,5	13,9 \pm 10,1
372	6	7,4 \pm 4,5	7,2 \pm 4,9
7235	7	24,5 \pm 13,9	22,1 \pm 12,7
5381	5	16,1 \pm 13,1	14,8 \pm 13,1
		18,3 \pm 15,5	17,2 \pm 14,6

Mittelwerte \pm SD

Nicht alle gewonnenen Ejakulate konnten vollständig analysiert werden. Einige Ejakulate enthielten keine oder nur einzelne Spermatozoen, bei einem Ejakulat blieben alle Spermatozoen im Koagulum eingeschlossen, sodass keine freien, nutzbaren Spermatozoen gewonnen werden konnten, vier Ejakulate enthielten keine motilen Spermatozoen. Alle Ejakulate von Tier 5381 waren mit Urin kontaminiert und damit nicht nutzbar.

Ejakulatgewicht und -volumen der Ejakulate mit vollständiger Analyse

Tiernummer	n	Ejakulatgewicht (mg)	Ejakulatvolumen (μ m)
8172	6	32,9 \pm 30,9	31,6 \pm 28,5
7815	7	16,8 \pm 9,8	17,0 \pm 9,6
8249	7	9,8 \pm 9,6	9,3 \pm 9,5
372	6	7,4 \pm 4,5	7,2 \pm 4,9
7235	7	24,5 \pm 13,9	22,1 \pm 12,7
		19,1 \pm 18,0	18,1 \pm 16,8

Mittelwerte \pm SD

Mikroskopische Ejakulatuntersuchung

Tiernummer	n	Konzentration (x 10 ⁶ /ml)	Anzahl (x 10 ⁶)	lebend (%)	motil (%)
8172	5	732,1 ± 660,0	36,0 ± 46,4	61,1 ± 19,2	40,8 ± 24,2
7815	4	181,6 ± 113,9	4,4 ± 2,7	63,3 ± 3,3	30,8 ± 21,6
8249	3	289,8 ± 168,23	2,5 ± 2,8	67,7 ± 13,2	53,7 ± 19,1
372	6	625,3 ± 573,5	4,0 ± 3,9	72,6 ± 12,3	64,7 ± 13,6
7235	7	399,9 ± 234,7	7,2 ± 4,6	82,9 ± 4,9	73,9 ± 9,6
		472,3 ± 445,6	11,2 ± 23,1	71,1 ± 13,8	55,7 ± 22,7

Mittelwerte ± SD

Kinematische Parameter

Tiernummer	n	VCL (µm/s)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	LIN	STR
8172	5	138,8 ± 12,9	85,8 ± 12,9	45,9 ± 15,9	30,4 ± 9,3	51,5 ± 9,4
7815	4	125,7 ± 32,7	79,3 ± 34,6	45,2 ± 24,5	31,5 ± 8,1	57,7 ± 3,6
8249	3	153,2 ± 16,9	108,5 ± 18,6	63,0 ± 13,4	34,5 ± 4,6	51,2 ± 1,5
372	6	136,5 ± 36,6	101,1 ± 28,2	59,9 ± 18,9	40,7 ± 10,4	53,9 ± 9,5
7235	7	149,8 ± 18,3	106,7 ± 13,1	69,2 ± 11,8	39,9 ± 5,1	58,1 ± 5,6
		140,6 ± 23,6	96,5 ± 21,9	57,1 ± 17,4	36,0 ± 8,1	54,7 ± 6,8

Mittelwerte ± SD

Tiernummer	n	MAD (°)	BCF (Hz)	ALH (µm)
8172	5	45,4 ± 7,8	9,7 ± 2,2	7,6 ± 1,5
7815	4	49,0 ± 11,5	7,0 ± 2,0	7,5 ± 1,4
8249	3	41,3 ± 3,3	10,4 ± 3,9	7,7 ± 2,4
372	6	36,3 ± 9,8	11,6 ± 9,5	12,1 ± 12,7
7235	7	40,6 ± 3,8	10,4 ± 3,2	7,9 ± 2,4
		42,1 ± 7,9	9,9 ± 4,8	8,8 ± 5,9

Mittelwerte ± SD

Von jedem Ejakulat wurden 300 Spermatozoenbahnen analysiert.

Spermatozoenmorphologie

Morphometrie

Tiernummer	n	Kopflänge (µm)	Kopfbreite (µm)	L/B	Schwanzlänge (µm)	Gesamtlänge (µm)
8172	200	5,37 ± 0,23	3,16 ± 0,16	1,70 ± 0,10	55,74 ± 2,97	61,12 ± 2,98
7815	200	5,82 ± 0,30	3,37 ± 0,23	1,73 ± 0,11	56,09 ± 2,18	61,92 ± 2,24
8249	200	5,81 ± 0,23	3,23 ± 0,15	1,80 ± 0,11	55,29 ± 2,08	61,10 ± 2,12
372	200	5,44 ± 0,26	3,21 ± 0,15	1,70 ± 0,10	54,41 ± 2,15	59,85 ± 2,24
7235	200	5,20 ± 0,25	3,15 ± 0,17	1,66 ± 0,10	53,41 ± 3,22	58,60 ± 3,25
		5,58 ± 0,36	3,22 ± 0,19	1,74 ± 0,12	55,16 ± 2,66	60,74 ± 2,79

Mittelwerte ± SD

200 Spermatozoen pro Tier wurden vermessen

Pathomorphologie

Tiernummer	n	Defekte gesamt (%)	Kopfdefekte (%)	Hals/ Mittelstück (%)	Schwanz- defekte (%)	cytopl. Tropfen (%)
8172	5	50,2 ± 10,5	4,0 ± 2,1	13,2 ± 3,3	32,5 ± 9,4	0,5 ± 0,5
7815	4	65,8 ± 24,0	2,9 ± 0,6	17,1 ± 8,5	43,4 ± 17,3	2,4 ± 1,4
8249	3	21,8 ± 7,1	3,0 ± 0,5	5,3 ± 2,4	12,5 ± 5,2	1,0 ± 0,0
372	6	31,6 ± 9,6	2,4 ± 0,7	12,8 ± 3,1	15,5 ± 7,8	0,9 ± 0,4
7235	7	20,4 ± 9,4	1,8 ± 0,4	7,6 ± 2,8	10,6 ± 6,6	0,4 ± 0,5
		36,5 ± 20,7	2,7 ± 1,3	11,2 ± 5,5	21,6 ± 15,4	0,9 ± 0,9
Mittelwerte ± SD						

3. Ejakulatuntersuchung *Saguinus oedipus*

3.1 RPE

Makroskopische Ejakulatuntersuchung

Ejakulatgewicht und -volumen aller gewonnenen Ejakulate

Tiernummer	n	Ejakulatgewicht (mg)	Ejakulatvolumen (μ m)
8471	5	19,8 \pm 6,9	18,2 \pm 7,1
7900	6	52,9 \pm 35,5	50,5 \pm 34,3
7296	6	35,6 \pm 16,1	30,0 \pm 15,8
8814	5	44,6 \pm 25,8	45,6 \pm 26,8
8522	5	41,9 \pm 24,3	41,0 \pm 20,8
8553	5	25,8 \pm 4,7	24,2 \pm 5,0
		37,2 \pm 23,4	35,3 \pm 22,9

Mittelwerte \pm SD

Nicht alle gewonnenen Ejakulate konnten vollständig analysiert werden. Ein Ejakulat enthielten nur einzelne Spermatozoen, bei fünf Ejakulaten blieben alle Spermatozoen im Koagulum eingeschlossen, sodass keine freien, nutzbaren Spermatozoen gewonnen werden konnten.

Ejakulatgewicht und -volumen der Ejakulate mit vollständiger Analyse

Tiernummer	n	Ejakulatgewicht (mg)	Ejakulatvolumen (μ m)
7900	5	60,9 \pm 33,1	58,2 \pm 32,1
7296	5	37,0 \pm 17,6	30,8 \pm 17,5
8814	5	44,6 \pm 25,8	45,6 \pm 26,8
8522	5	42,0 \pm 24,4	41,0 \pm 20,8
8553	5	25,8 \pm 4,7	24,2 \pm 5,0
		42,0 \pm 24,2	39,9 \pm 23,8

Mittelwerte \pm SD

Mikroskopische Ejakulatuntersuchung

Tiernummer	n	Konzentration ($\times 10^6$ /ml)	Anzahl ($\times 10^6$)	lebend (%)	motil (%)
7900	5	277,7 \pm 128,5	15,1 \pm 11,2	65,5 \pm 20,0	60,6 \pm 19,4
7296	5	170,7 \pm 160,0	5,5 \pm 3,3	82,8 \pm 7,8	60,2 \pm 25,3
8814	5	94,4 \pm 31,0	4,3 \pm 2,2	72,9 \pm 14,5	56,4 \pm 24,2
8522	5	293,8 \pm 77,9	12,4 \pm 6,8	80,4 \pm 9,3	65,0 \pm 8,6
8553	5	89,9 \pm 84,5	2,4 \pm 2,5	74,7 \pm 8,1	64,6 \pm 9,7
		185,3 \pm 131,4	7,9 \pm 7,6	75,3 \pm 13,3	61,4 \pm 17,5

Mittelwerte \pm SD

Kinematische Parameter

Tiernummer	n	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	LIN	STR
7900	5	170,5 \pm 30,8	104,9 \pm 36,7	69,3 \pm 34,9	33,7 \pm 14,3	56,3 \pm 12,4
7296	5	166,9 \pm 43,8	118,0 \pm 50,3	85,7 \pm 48,3	45,2 \pm 20,1	65,7 \pm 11,9
8814	5	168,7 \pm 17,1	103,2 \pm 9,8	68,5 \pm 11,0	37,1 \pm 6,8	60,8 \pm 4,2
8522	5	179,6 \pm 17,9	123,6 \pm 24,4	86,1 \pm 26,7	43,1 \pm 10,9	62,7 \pm 8,0
8553	5	164,9 \pm 18,0	107,4 \pm 16,2	68,4 \pm 14,9	35,7 \pm 7,0	56,1 \pm 4,8
		170,1 \pm 25,7	111,4 \pm 29,5	75,6 \pm 29,0	39,0 \pm 12,6	60,3 \pm 9,0

Mittelwerte \pm SD

Tiernummer	n	MAD ($^{\circ}$)	BCF (Hz)	ALH (μm)
7900	5	55,0 \pm 16,2	14,7 \pm 5,2	6,7 \pm 0,9
7296	5	42,3 \pm 19,8	12,9 \pm 5,9	6,7 \pm 2,0
8814	5	45,7 \pm 6,0	16,9 \pm 1,6	6,1 \pm 1,7
8522	5	42,4 \pm 10,67	15,5 \pm 2,2	6,8 \pm 0,8
8553	5	47,9 \pm 7,9	13,4 \pm 2,9	6,4 \pm 1,4
		46,7 \pm 12,9	14,7 \pm 3,9	6,6 \pm 1,3

Mittelwerte \pm SD

5 Ejakulate pro Tier und 300 Spermatozoenbahnen pro Ejakulat wurden analysiert.

Spermatozoenmorphologie

Morphometrie

Tiernummer	n	Kopflänge (μm)	Kopfbreite (μm)	L/B	Schwanzlänge (μm)	Gesamtlänge (μm)
7900	200	5,57 \pm 0,24	3,30 \pm 0,19	1,69 \pm 0,12	59,38 \pm 2,07	64,95 \pm 2,10
7296	200	5,30 \pm 0,28	3,14 \pm 0,18	1,69 \pm 0,11	59,70 \pm 1,77	65,00 \pm 1,80
8814	200	5,72 \pm 0,25	3,51 \pm 0,17	1,63 \pm 0,10	60,39 \pm 2,03	66,12 \pm 2,09
8522	200	5,37 \pm 0,34	3,15 \pm 0,18	1,71 \pm 0,12	58,40 \pm 1,79	63,78 \pm 1,83
8553	200	5,67 \pm 0,25	3,52 \pm 0,18	1,62 \pm 0,10	59,23 \pm 1,85	64,90 \pm 1,90
		5,53 \pm 0,32	3,32 \pm 0,24	1,67 \pm 0,11	59,43 \pm 2,01	64,96 \pm 2,08

Mittelwerte \pm SD

200 Spermatozoen pro Tier wurden vermessen

Pathomorphologie

Tiernummer	n	Defekte gesamt (%)	Kopfdefekte (%)	Hals/ Mittelstück (%)	Schwanz- defekte (%)	cytopl. Tropfen (%)
7900	5	22,0 \pm 7,2	4,3 \pm 1,5	5,5 \pm 2,0	11,9 \pm 3,8	0,3 \pm 0,5
7296	5	13,9 \pm 1,7	3,6 \pm 0,6	2,8 \pm 0,8	7,2 \pm 1,8	0,3 \pm 0,3
8814	5	28,4 \pm 10,5	6,1 \pm 2,3	7,3 \pm 3,3	14,6 \pm 6,9	0,4 \pm 0,4
8522	5	14,4 \pm 3,3	3,6 \pm 0,9	3,5 \pm 1,4	6,9 \pm 1,1	0,4 \pm 0,4
8553	5	19,3 \pm 8,1	3,2 \pm 1,4	6,1 \pm 3,8	9,7 \pm 3,4	0,3 \pm 0,3
		19,6 \pm 8,4	4,2 \pm 1,7	5,0 \pm 2,9	10,1 \pm 4,7	0,3 \pm 0,4

Mittelwerte \pm SD

10. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Keith Hodges danke ich für die Überlassung des Themas und für die freundschaftliche Aufnahme in die Abteilung Reproduktionsbiologie des Deutschen Primatenzentrums.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd Hoffmann danke ich für die Betreuung am Fachbereich Veterinärmedizin.

Auch möchte ich Herrn Dr. Michael Heistermann für die freundschaftliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für all seine Hilfe die mir zuteil wurde danken.

Besonderer Dank gilt Susanne Rensing für die tatkräftige Unterstützung bei allen die Tiere betreffenden Problemen.

Meinen Mitdoktoranden und anderen Mitarbeitern der Abteilung danke ich für die Hilfe bei der Gewinnung der Ejakulate, namentlich Michael Wicherek, Ulrike Möhle, Thomas Ziegler, Marion Fies, Akka Oerke und insbesondere Sabine Pudritz sowie Nicole Umland.

Für Ratschläge bezüglich der computerunterstützten Bildanalyse der Spermatozoenbeweglichkeit danke ich Frau Dr. C. H. Yeung, Institut für Reproduktionsmedizin der Universität Münster.

Herrn PD Dr. Gerhard Weinbauer und Herrn Martin Heuermann, Institut für Reproduktionsmedizin der Universität Münster, danke ich für Ratschläge zur RPE und für die Demonstration der RPE bei Makaken.

Frau Dr. Kerstin Metz-Rensing danke ich für die Anfertigung der EM-Aufnahmen.

Für ihre Beratungen bezüglich der statistischen Auswertung der Versuche bin ich Dr. Dietmar Zinner und Dr. Dr. Michael Schwibbe dankbar.

Besonders herzlich danke ich meinen Eltern Christel und Otto Schneiders, die mir meine Ausbildung und diese Arbeit durch ihre umfassende Unterstützung ermöglicht haben.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-427-6



9 783896 874276